# Onkogene Signalwege
# bei der Infektion mit Adenoviren

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Michael Schümann**

aus Düsseldorf

Marburg/Lahn, November 2005

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 27. Januar 2006 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker
Zweitgutachter: Prof. Dr. Matthias Dobbelstein

Tag der mündlichen Prüfung am 10. Februar 2006.

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:
Prof. Dr. Erhard Bremer
Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

## INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis III

**1 ZUSAMMENFASSUNG 1**

**2 EINLEITUNG 2**

**2.1 Adenoviren - ein kurzer Überblick 2**

**2.2 Die Antwort der Zelle auf eine Virusinfektion 3**

**2.3 Ras-abhängige Signaltransduktion und Onkogenese 7**

**2.4 Die virusvermittelte Onkolyse zur Therapie von Tumoren 9**

**2.5 PKR-sensitive Viren mit Ras-abhängiger Replikation 10**

**2.6 Fragestellung 13**

**3 MATERIAL 14**

**3.1 Chemikalien 14**
**3.2 Enzyme 14**
**3.3 Verbrauchsmaterialien 14**
**3.4 Kits 15**
**3.5 Antikörper 15**
**3.6 Oligonukleotide 16**
**3.7 Zellkulturmedien & Zusätze 17**
**3.8 Bakterien, Viren & eukaryotische Zellen 17**
**3.9 Plasmide&Vektoren 18**
**3.10 Puffer 18**
**3.11 Geräte 19**

**4 METHODEN 21**

**4.1 Zellbiologische und virologische Methoden 21**

4.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen 21
4.1.2 Präparation einer Virussuspension 21
4.1.3 Titration einer Virussuspension 21
4.1.4 Immunfluoreszenz 22
4.1.5 Infektion von Zellen 22

**4.2 Methoden zur Klonierung 23**

4.2.1 Plasmidpräparation 23
4.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 24
4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren 24
4.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion 24
4.2.5 Ethanolfällung 25
4.2.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen 25
4.2.7 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 26
4.2.8 Auffüllung nicht kompatibler, überhängender Enden 26
4.2.9 Dephosphorylierung von Vektor-DNA 27
4.2.10 Ligation 27
4.2.11 Chemische Transformation 28
4.2.12 Elektroporation 28
4.2.13 Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange-Mutagenese) 28
4.2.14 Herstellung der VA-RNA-defizienten Adenovirusmutanten 29

**4.3 Molekularbiologische Methoden mit Nukleinsäuren 31**

4.3.1 Transiente Transfektion 31
4.3.2 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen 31
4.3.3 Amplifikation von DNA-Genfragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion 31
4.3.4 Sequenzierung von DNA 32
4.3.5 Semi-quantitative real-time PCR 34
4.3.6 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen 34
4.3.7 Reverse Transkription 35
4.3.8 Semi-quantitative RT-PCR 35
4.3.9 Northern Blot 36
4.3.10 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden 37
4.3.11 Detektion von RNAs mittels DIG-markierter Sonden 37
4.3.12 Zellfraktionierung 38
4.3.13 Polyribosomenanalyse 38

**4.4 Proteinbiochemische Methoden 39**

4.4.1 Ernte von Zellen für anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 39
4.4.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 39
4.4.3 Western-Blot 40
4.4.4 Ponceau S-Färbung von Western Blots 40
4.4.5 Immunfärbung von Proteinen (nach Western Blot) 40
4.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 41
4.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Biuret-Reaktion 42

**5 ERGEBNISSE 43**

**5.1 Herstellung isogenischer Adenovirusmutanten mit defektiver VA-RNA Expression. 43**

**5.2 Ras-transformierte Zellen unterstützen die Replikation VA-RNA I-loser Adenoviren. 46**

**5.3 PKR bleibt trotz aktivierender Ras-Mutationen stimulierbar. 49**

**5.4 Die Inhibierung Ras-abhängiger Signalwege hemmt die Virusreplikation, hat aber keinerlei Einfluss auf die PKR-Aktivität. 53**

**5.5 Wechselseitige Verstärkung der Ras-abhängigen Signalwege und der Adenovirusreplikation. 55**

**5.6 Die Adenovirusreplikation lässt sich durch verschiedene MEK-Inhibitoren hemmen. 59**

**5.7 Aktives ERK unterstützt die Akkumulierung viraler Proteine in der späten Phase der Replikation. 59**

**5.8 Die Inhibierung von ERK unterbindet die Translation. 62**

**5.9 Der Einfluss verschiedener ERK-abhängiger Translationsregulatoren auf die Adenovirusreplikation. 64**

**6 DISKUSSION 67**

**6.1 Adenoviren aktivieren Ras-abhängige Signalwege. 67**

**6.2 Einfluss der Ras-Signalwege auf die Adenovirusreplikation. 68**

6.2.1 PI3K/AKT 68
6.2.2 Raf/MEK/ERK 68

**6.3 Adenovirale Onkolyse: Ras-abhängige Replikation VA-RNA-loser Adenoviren. 72**

6.3.1 PKR-Aktivierung trotz mutiertem Ras 72
6.3.2 Die Ras-abhängige Transformation 74
6.3.3 PKR-abhängige Signalwege und premature Seneszenz 76

**7 LITERATUR 80**

## Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| AKT | Protein Kinase B, Substrat der PI3K |
| AraC | Cytosin-arabinofuranosid |
| bp | Basenpaare |
| CHX | Cycloheximid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| dVA | VA-RNA-lose Adenovirusmutanten |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eIF | eukaryotic initiation factor |
| ERK | Extracellularly regulated kinase |
| f. f. u. | fluorescence forming units (s. 4.1.3) |
| FADD | FAS-associating death domain-containing protein |
| HSV | Herpes Simplex Virus |
| IFN | Interferon |
| M. O. I. | multiplicity of infection |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase |
| MCS | multiple cloning site |
| MEK | Mitogen-activated ERK kinase |
| MNK | MAPK interacting kinase |
| NDV | Newcastle Disease Virus |
| PI3K | Phosphatidyl-inositol-3-Kinase |
| PKR | Protein Kinase, aktiviert durch doppelsträngige RNA |
| SDS | Sodiumdodecylsulfate |
| VA-RNA | virus-associated RNA |
| VSV | Vesikuläres Stomatitis Virus |

# 1 Zusammenfassung

Konditional replizierende Viren werden derzeit hinsichtlich ihrer Einsetzbarkeit in der Krebstherapie untersucht, mit dem Ziel der spezifischen, Virus-vermittelten Onkolyse. Ein vielversprechender onkolytischer Ansatz beruht auf der Beobachtung, dass aktiviertes Ras, wie es in 30 % aller malignen Tumoren vorkommt, möglicherweise die Aktivität der PKR, einer zentralen Kinase der wirtszelleigenen Virusabwehr, beeinträchtigt. Auf diese Weise könnten PKR-sensitive Viren selektiv in Ras-transformierten Tumorzellen replizieren, während das umliegende Gewebe verschont bleibt. Nach aussichtsreichen Versuchen mit Reoviren und Vesikulären Stomatitis Viren, die eine natürliche Sensitivität gegenüber der PKR-Wirkung besitzen, folgten Versuche mit PKR-sensitiven Virusmutanten, wie z. B. Influenza Virus dNS1 und Herpes Simplex Virus R3616. Nachteile all dieser onkolytischen Viren sind zum einen die schlechte genetische Manipulierbarkeit und zum anderen die hohe Pathogenität der Parentalviren. Adenoviren hingegen verursachen weitgehend ungefährliche Krankheiten und dienen als gut charakterisiertes System schon lange als Vektoren in der Gentherapie.

In dieser Doktorarbeit ist es gelungen, das Prinzip der Ras-abhängigen Onkolyse auf Adenoviren zu übertragen. Durch gezielte Mutationen konnten PKR-sensitive Adenoviren (Ad dVA) hergestellt werden, und ihre selektive Replikationsfähigkeit konnte in verschiedenen Ras-transformierten Tumorzellen bestätigt werden. Mechanistische Untersuchungen ließen allerdings Zweifel an der Allgemeingültigkeit des molekularen Konzepts der Ras-abhängigen Replikation onkolytischer Viren aufkommen. Zum einen war mutiertes Ras nicht in der Lage, direkt mit der PKR-Aktivität zu interferieren. Zum anderen aktivierten Adenoviren gezielt Ras-abhängige Signalwege, um eine effiziente Translation zu gewährleisten. Wir vermuten deshalb indirekte Einflüsse der Ras-abhängigen Transformation auf PKR-Effektor-mechanismen als Urache für die erhöhte Permissivität von Ras-mutierten Tumor-zellen für PKR-sensitive Viren. In Übereinstimmung damit war die Fähigkeit zur PKR-vermittelten Apoptose in Ad dVA-permissiven Zellen stark eingeschränkt.

Unsere Ergebnisse befürworten grundsätzlich den Einsatz PKR-sensitiver Adenoviren in der Virus-vermittelten Onkolyse, unterstreichen aber zugleich die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen.

# 2 Einleitung

## 2.1 Adenoviren - ein kurzer Überblick

Die Familie der Adenoviridae beinhaltet eine Vielzahl weltweit vorkommender Viren, die vor allem Säuger, aber auch Vögel befallen können. Allein die Gruppe der humanpathogenen Adenoviren umfasst fast 50 Vertreter, die klassischerweise anhand ihrer serologischen Eigenschaften unterschieden werden. Adenoviren besitzen kleine, ikosaedrisch gebaute Capside ohne Membranhülle (Abb. 1). Sie wurden 1953 aus Tonsillen (Mandeln) und adenoidem (drüsenähnlichem) Gewebe isoliert. Beim Menschen rufen Adenoviren hauptsächlich Erkrankungen der Atemwege, aber auch des Gastrointestinaltrakts und der Bindehaut des Auges hervor (Keratokonjunktivitis). Rund die Hälfte aller Adenovirusinfektionen verlaufen allerdings symptomlos. Die Serotypen 2 und 5 der humanen Adenoviren (Ad2, Ad5) lassen sich sehr gut in Zellkultur vermehren und sind daher besonders gut charakterisiert. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Adenoviren des Serotyps 5 verwendet.

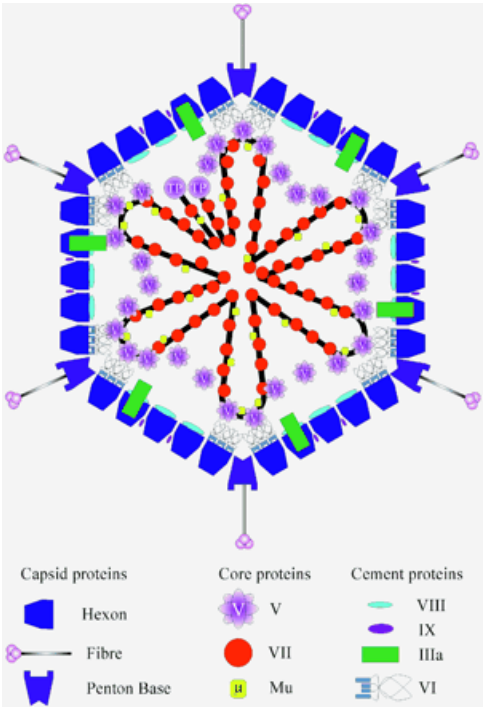



**Abb. 1. Struktur des Adenovirus.** Schematische Darstellung eines adenoviralen Capsids mit den wichtigsten strukturgebenden Komponenten. (aus Russell, 2000)

Das Genom der Adenoviren besteht aus doppelsträngiger DNA. Je nach Virustyp umfasst es 36000 bis 38000 Basenpaare. Die Genprodukte werden nach ihrer zeitlich organisierten Synthese in frühe, funktionale Proteine (E1 bis E4) und späte Strukturproteine (L) eingeteilt (Abb. 2). Außerdem existieren zwei Gene, aus denen kleine, nicht proteinkodierende RNA-Moleküle, die virusassoziierten RNA-Spezies I und II (VA-RNA I + II), synthetisiert werden.

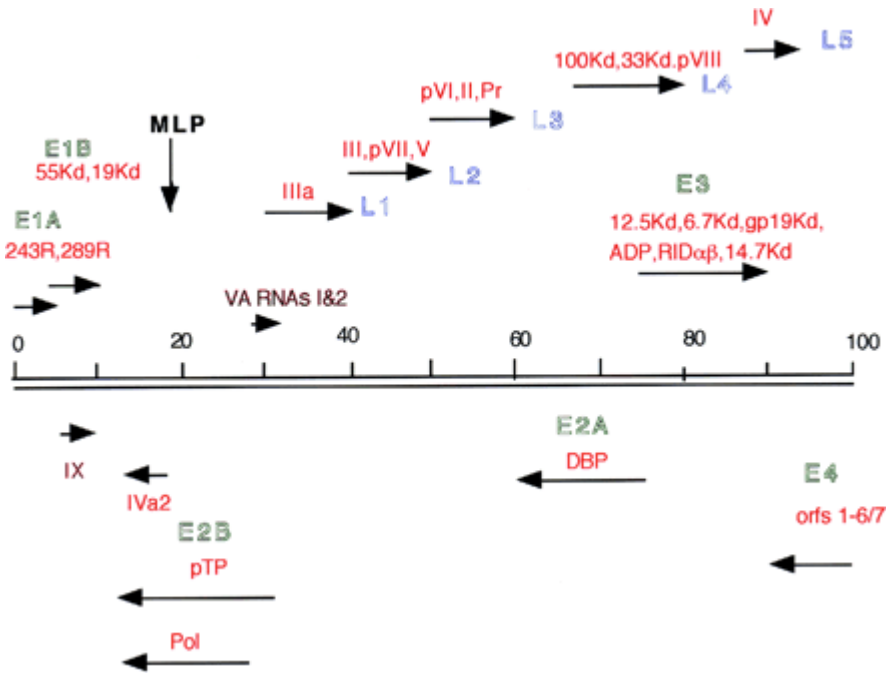



**Abb. 2. Das Genom der Adenoviren.** Schematische Darstellung der Transkriptionseinheiten des Adenovirus. Die Gene der frühen Proteine sind grün, die der späten Proteine blau unterlegt. Die Genprodukte sind rot dargestellt. Die Pfeile deuten die Orientierung der Gene auf dem Genom an. (aus Russell, 2000)

Der Infektionszyklus der Adenoviren lässt sich in vier Phasen einteilen. Zunächst werden die frühen Gene transkribiert und die entsprechenden Proteine hergestellt. Daran schließt sich die Phase der DNA-Replikation an. Nach Beginn der DNA-Replikation werden die Transkripte der späten Gene erstellt und daraus die Strukturproteine synthetisiert. Zum Schluss erfolgt die Morphogenese und Freisetzung der Viruspartikel. In HeLa-Zellen dauert ein solcher Replikationszyklus bis zur Bildung der ersten Viruspartikel etwa 24 Stunden. Die Zahl der Nachkommenviren beträgt ungefähr Zehntausend pro Zelle (Lehrbücher: Modrow et al., 2001; Shenk, 1996).

## 2.2 Die Antwort der Zelle auf eine Virusinfektion

### Interferon

Virusinfizierte Zellen verfolgen zwei grundlegende Strategien, um einer Virusinfektion zu begegnen. Zunächst alarmieren sie umliegende Zellen und Zellen des Immunsystems, indem sie Signalstoffe, sogenannte Cytokine, ausschütten. Die Interferone sind die wichtigsten Cytokine der antiviralen Immunantwort (Malmgaard,

2004; Perry et al., 2005). Außerdem versuchen infizierte Zellen, die Virusausbreitung möglichst lange hinauszuzögern. Dies kann, zum Beispiel, durch die Arretierung des Zellzyklus oder gar durch Apoptose, den programmierten Zelltod, gelingen. Allerdings braucht die Durchführung solcher Maßnahmen Zeit, die das Virus gleichermaßen nutzen kann, um entsprechende Gegenmaßnahmen einzuleiten. Eine effiziente Möglichkeit, die virale Replikation zu stören, bietet daher die Inhibition der Translation. Sie verhindert zwar unmittelbar die zelluläre Proteinsynthese, aber auch die Produktion viraler Proteine. Die „Übernahme“ der Zelle durch das Virus wird dadurch aufgehalten, und die Ausbreitung der Viren im Gewebe kann einstweilen verhindert werden. Auch wenn ein solcher Translationsarrest von vielen Viren wirkungsvoll antagonisiert werden kann, erhält das Immunsystem wertvolle Zeit, um auf die Virusinfektion zu reagieren.

**PKR**

Eine zentrale Rolle bei der Vermittlung des Translationsarrests spielt die durch Interferon induzierbare PKR („protein kinase activated by double-stranded RNA“), die – wie ihr Name bereits verrät – durch doppelsträngige RNA aktiviert wird (Williams, 1999). Doppelsträngige RNA entsteht als Zwischenprodukt der viralen Replikation. Zum einen gibt es Viren, deren Genom bereits aus doppelsträngiger RNA besteht (z. B. Reoviren). Zum anderen sind Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom darauf angewiesen, ihre Erbinformation in ein komplementär-gegenläufiges Intermediat zu übersetzen, das dann als Matrize zur Herstellung neuer Genome dient. Genom und Antigenom können eine perfekte RNA-Duplex ausbilden. Der Großteil der doppelsträngigen RNA entsteht jedoch wahrscheinlich als Folge der kompakten Organisation viraler Genome. Die viralen Transkriptionseinheiten sind nicht nur in enger, zum Teil sogar überlappender Abfolge auf dem Genom angeordnet, sondern auch in beiden Leserichtungen. Komplementäre Transkripte aus überlappenden Genen bilden ideale Partner zur Hybridisierung. Die PKR besitzt zwei spezifische Bindestellen für RNA-Doppelstränge. Die Bindung führt zur Dimerisierung zweier PKR-Moleküle (Dey et al., 2005; Taylor et al., 2005), gefolgt von der aktivierenden Autophosphorylierung (Abb. 3). In aktiviertem Zustand phosphoryliert die PKR die $\alpha$-Untereinheit von eIF2, einem trimeren Initiationsfaktor der Translation. Die Aufgabe dieses Translationsfaktors besteht darin, die Methionyl-tRNA zur Translations-initiation zur 40S-Untereinheit des Ribosoms zu transportieren. Die $\alpha$-Untereinheit

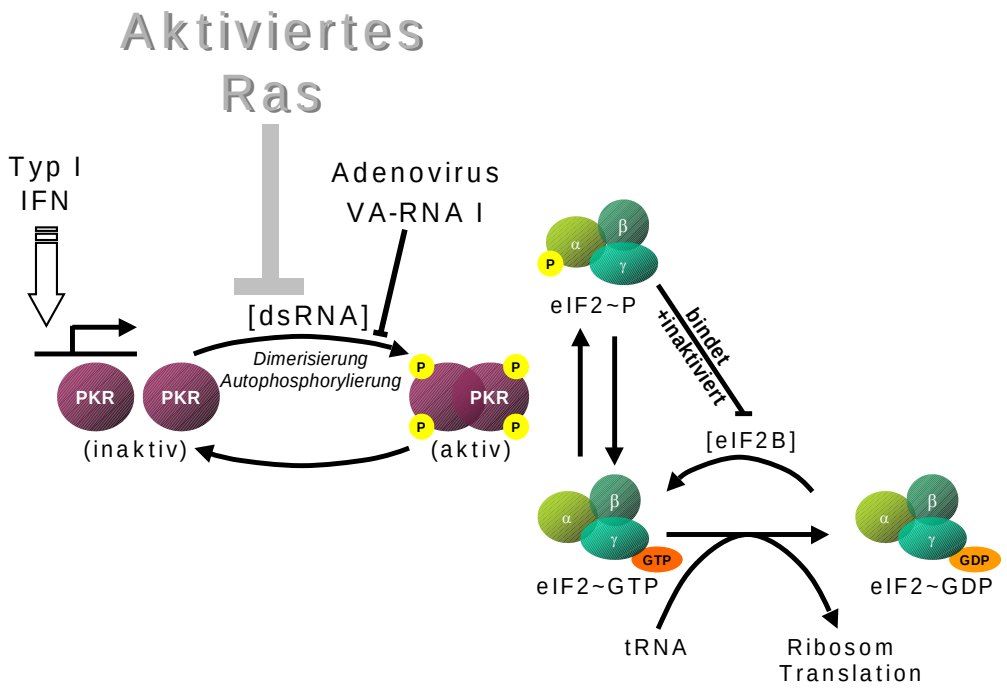



**Abb. 3. Regulation und Aktivierung der PKR.** Typ I Interferone induzieren die Transkription des *pkr*-Gens. Doppelsträngige RNA (dsRNA) führt zur Dimerisierung und Aktivierung der PKR durch Autophosphorylierung. Die virus-assoziierte (VA) RNA I der Adenoviren und aktivierte Ras-Signalwege können die Aktivierung verhindern. Die Phosphorylierung der α-Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF2 durch aktive PKR führt zur Komplexierung des GTP-regenerierenden Co-Faktors eIF2B und als Folge dessen zu einem Translationsarrest.

besitzt dabei eine regulatorische Funktion, während die β- und γ-Untereinheiten unter Verbrauch von GTP die katalytische Aktivität ausüben. Die Regenerierung des eIF2-gebundenen GDPs wird von eIF2B, einem weiteren Translationsfaktor, katalysiert. Bei eIF2B handelt es sich um ein Heteropentamer. Phosphoryliertes eIF2α besitzt eine stark erhöhte Affinität zu eIF2B und blockiert durch seine Bindung die Funktion des Regenerationsfaktors. Da eIF2B lediglich in katalytischen Mengen in der Zelle vorkommt, sind die zellulären Reservoirs schnell erschöpft. Verbliebenes unphosphoryliertes eIF2~GDP wird nicht mehr regeneriert und es kommt zum Stopp der Translation. Da ein Translationsstopp den Stillstand der Virusreplikation bedeutet, haben Adenoviren, wie viele anderen Viren auch, eigens einen Mechanismus entwickelt, diesen Zustand zu verhindern.

### Adenovirus-assoziierte RNAs

Während der Replikation produzieren Adenoviren große Mengen virus-assoziierter (VA) RNAs. Adenoviren der Serotypen 5 und 2 besitzen jeweils zwei, wahrscheinlich

durch Genduplikation entstandene Gene, die diese RNAs mit entsprechend hoher Sequenzidentität kodieren (Ma and Mathews, 1996). Die Gene liegen zentral im Adenovirusgenom und besitzen einen Promotor, der dem der zellulären tRNAs ähnelt und demzufolge auch die Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase III einleitet (Guilfoyle and Weinmann, 1981). Die VA-RNAs sind etwa 160 Nukleotide lang, werden nicht translatiert, bilden aber eine ausgeprägte Sekundärstruktur aus (Abb. 4), die sie quasi als doppelsträngiges RNA-Molekül erscheinen lässt. Aufgrund dieser Tatsache vermögen sie mit den RNA-Bindestellen der PKR zu interagieren. Jedoch verhindert die zentrale Stem-Loop-Struktur der VA-RNA I die Dimerisierung der PKR und somit ihre Aktivierung (Ghadge et al., 1991).

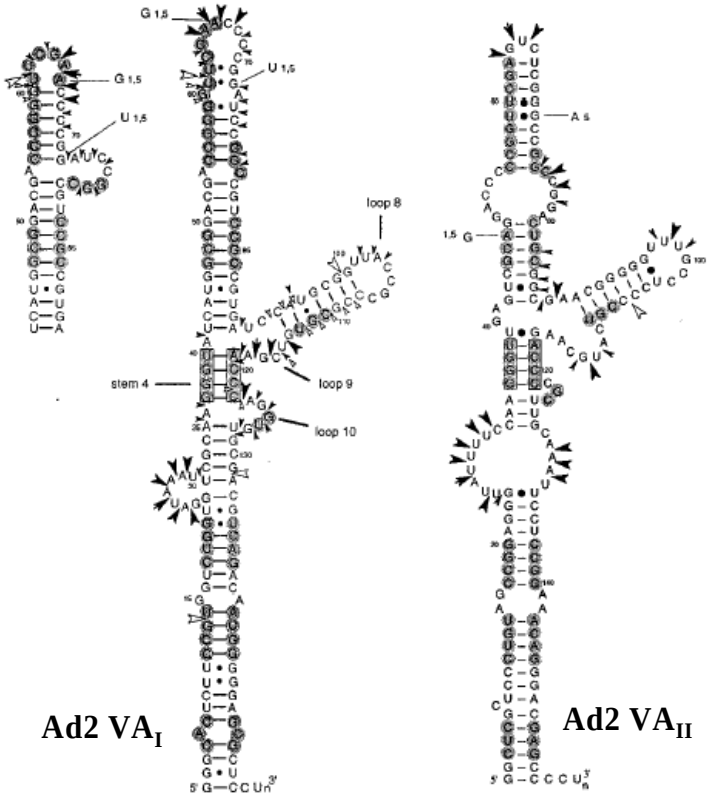



**Abb. 4. Struktur der VA-RNAs.** Dargestellt sind die experimentell ermittelten Sekundärstrukturen der beiden VA-RNAs des Adenovirus Typ 2. Die zentrale Stem-Loop-Domäne ist in der Lage, die Dimerisierung der PKR zu verhindern. (aus Ma and Mathews, 1996)

Durch gezielte Deletion der intragenischen Promotorbereiche der VA-RNA-Gene konnten Adenovirusmutanten mit fehlender VA-RNA-Expression generiert werden. Bereits vor über 20 Jahren gelang die Herstellung einer VA-RNA I-defektiven Mutante (Ad dl331) (Schneider et al., 1984) und führte zu großen Fortschritten bei der Aufklärung der PKR-Funktion (Kitajewski et al., 1986a). Ad dl331 besitzt in Zellen mit intakter PKR-vermittelter Abwehr eine nachhaltig reduzierte Proteinsynthese und ist daher in seiner Replikationsfähigkeit stark eingeschränkt. Die nähere Untersuchung der Mutante offenbarte aber, dass die Replikationsfähigkeit des Virus in Abhängigkeit von der Wirtszelle stark variieren und sogar Wildtyp-Niveau erreichen kann

(Kitajewski et al., 1986b). Konkrete Ursachen dafür konnten jedoch nicht gefunden werden.

Es besteht seit längerem der Verdacht, dass die PKR-vermittelte Translationsregulation in Krebszellen gestört sein kann. Allerdings ist unklar, ob diese Fehlfunktion eine Folge eingeschränkter PKR-Aktivität oder defekter Effektormechanismen oder gar eine Kombination aus beidem ist (Balachandran and Barber, 2004). Es scheint jedenfalls, als könnte ein solcher PKR-Defekt aktiv zur Krebsentstehung beitragen (Garcia et al., 2002; Gimenez-Barcons et al., 2005; Perkins and Barber, 2004). Den erhofften Hinweis auf eine Verbindung zwischen aberranter PKR-Funktion und zellulärer Transformation lieferten (Mundschau and Faller, 1992). Sie konnten zeigen, dass aktives, onkogenes Ras in der Lage ist, die Aktivierung der PKR durch doppelsträngige RNA zu unterbinden. Dieser Effekt war keine Folge der zellulären Transformation im Allgemeinen, sondern ließ sich spezifisch auf die Wirkung von onkogenem Ras zurückführen. Sie postulierten die Induktion eines PKR-inhibierenden Proteins durch Ras, dessen Identifizierung allerdings bis heute aussteht.

## 2.3 Ras-abhängige Signaltransduktion und Onkogenese

Die Ras-Proteine sind die prototypischen Vertreter einer Gruppe von kleinen GTPasen, die eine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion einnehmen. Bisher wurden drei verschiedene Ras-Moleküle beschrieben, H-Ras, K-Ras und N-Ras, die sich trotz hoher Sequenzidentität nicht nur in ihrer Funktion, sondern offenbar auch in ihrer subzellulären Lokalisation voneinander unterscheiden (Hancock, 2003). In ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form sind diese Moleküle in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Effektormoleküle zu aktivieren. Zu den bekanntesten Effektoren zählen die Raf-Kinasen und die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) (Malumbres and Pellicer, 1998). Die Raf-Kinasen bilden den Ausgangspunkt einer Signalkaskade, die durch Aktivierung von MEK („mitogenic ERK kinase“) und ERK („extracellular regulated kinase“) hauptsächlich proliferative Signale vermittelt (Chang et al., 2003). Das wichtigste Substrat der PI3K ist die Proteinkinase B, auch AKT genannt, die neben proliferativen Stimuli vor allem antiapoptotische Signale transduziert, aber auch grundlegende, zelluläre Prozesse,

wie z. B. das mRNA-Spleißen und die Translation, regulieren kann (Osaki et al., 2004).

Aufgrund der Identifizierung tumorigener v-Ras-Proteine in Retroviren (Harvey, 1964), aber auch aufgrund der großen Häufigkeit von *ras* Mutationen in malignen Tumoren (Bos, 1989), waren die *ras*-Gene die ersten Onkogene, die als solche beschrieben wurden. Mutationen der Aminosäuren an den Positionen 12, 13, 59, 61 oder 63 führen zu einer Einschränkung der GTPase-Aktivität und erhöhen dadurch den Anteil der Ras-Proteine in der GTP-gebundenen, aktiven Konformation (Lowy and Willumsen, 1993). Der daraus resultierenden Zunahme proliferativer Signale, vor allem durch die Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade, wird eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung und der Aufrechterhaltung der zellulären Transformation und der Krebsentstehung zugerechnet (Brummelkamp et al., 2002; Kerkhoff and Rapp, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der Ras-abhängigen Wachstumssignale ausreicht, das Wachstum transformierter Zellen zu unterbinden (Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). Aus diesem Grund gibt es seit längerer Zeit intensive Bemühungen, pharmakologische Substanzen zu finden, die die Komponenten der Ras-abhängigen Signalwege selektiv blockieren können mit dem Ziel, diese zur Krebstherapie einzusetzen.

Trotz dieser wichtigen Bedeutung von Ras für das Wachstum von Krebszellen, ist die wachstumsfördernde Wirkung von aktiviertem Ras normalerweise nicht ausreichend, um eine primäre Zelle vollständig zu transformieren. Vielmehr löst die dauerhafte Aktivierung von Ras ein Schutzprogramm der Zelle aus, das zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest, der prematuren Seneszenz, führt (Lin et al., 1998; Serrano et al., 1997). Die Aktivierung weiterer Onkogene oder die Inaktivierung von Tumorsuppressoren ist notwendig, um die zelluläre Zellzykluskontrolle zu überwinden und die Zelle vollständig zu transformieren (Boehm et al., 2005; Carnero and Beach, 2004; Hahn et al., 1999; Voorhoeve and Agami, 2004). Dieses Szenario der Ras-vermittelten Transformation unterstreicht das Konzept von der Krebsentstehung als mehrschrittigem Prozess.

Die Mutation einzelner Gene ist ein grundsätzlich ungerichteter Prozess, und die Aushebelung der zellulären Wachstumsregulation im Zuge der Transformation stellt lediglich die Summe mehrerer, zufälliger Einzelmutationen dar. Dennoch verursacht sie genau den Zustand, den Viren während einer lytischen Infektion gezielt

herbeizuführen versuchen. Diese Wesensverwandtschaft exponiert Tumorzellen in besonderer Weise für eine erfolgreiche Virusinfektion.

## 2.4 Die virusvermittelte Onkolyse zur Therapie von Tumoren

Schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts beobachtete man, dass sich in virusinfizierten Patienten bestehende Tumoren vereinzelt spontan zurückbildeten (De Page, 1912). Diese Beobachtung begründete das Konzept der virusvermittelten Onkolyse. Nach anfänglichen Rückschlägen griff man diese Strategie der Krebsbekämpfung erst Mitte des letzten Jahrhunderts wieder auf (Huebner et al., 1956; Webb and Smith, 1970). Die rasanten Fortschritte der Molekularbiologie und die dadurch entstandenen Möglichkeiten zur gezielten Veränderung von Viren belebten das Konzept der virusvermittelten Onkolyse zum Ende des letzten Jahrhunderts neu (Markert et al., 1993; Martuza et al., 1991).

Mittlerweile wird eine Vielzahl von Viren auf ihr onkolytisches Potential untersucht. Zum einen verwendet man dabei natürlich vorkommende, attenuierte Viren, wie z. B. Reoviren, Vesikuläre Stomatitis Viren (VSV) oder Newcastle Disease Viren (NDV), die sich von vornherein bevorzugt in Tumorzellen replizieren. Zum anderen versucht man aber auch hochreplikative Viren, wie Adenoviren, oder sogar hochpathogene Viren, wie Herpes Simplex Viren (HSV), Vaccinia Viren oder Polioviren, derart genetisch zu verändern, dass ihr Wachstum auf Tumorzellen beschränkt bleibt (Chiocca, 2002). Dabei werden verschiedene Strategien angewendet, um diesen Viren Tumorspezifität zu verleihen. Zum einen versucht man, die viralen Rezeptoren derart zu verändern, dass sie gezielt mit tumorzellspezifischen Oberflächenmolekülen interagieren und so im Idealfall ausschließlich Tumorzellen infizieren können. Zum anderen versucht man, die Replikation der Viren speziell auf Tumorzellen auszurichten. Dies kann durch die Expression viraler Gene unter Kontrolle eines tumorspezifischen Promotors gelingen, oder aber durch die gezielte Deletion viraler Gene, deren Expression speziell in Tumorzellen entbehrlich ist. Solche Gene kodieren zumeist Antagonisten von Tumorsuppressoren oder Aktivatoren von Onkogenen. Zusätzlich gibt es verschiedene Ansätze, die Wirksamkeit onkolytischer Viren zu verstärken. Dies kann zum einen durch den kombinierten Einsatz onkolytischer Viren mit antitumoralen Medikamenten oder auch

durch die gezielte Modulation der Immunantwort während der virusvermittelten Onkolyse erfolgen. Zum anderen testet man die Integration zytotoxischer Gene in das Genom der onkolytischen Viren (weitere Reviews von Bell et al., 2003; Dobbelstein, 2004).

Das prominenteste Beispiel für ein onkolytisches Virus mit tumorspezifischer Replikation ist wohl ONYX-015 (Ries and Korn, 2002), der Firma Onyx Pharmaceuticals (Richmond, CA; (Cohen and Rudin, 2001)), das bereits in Phase I und II-Studien getestet wurde (Kirn, 2001). Diese Adenovirusmutante kann kein E1B-55kDa-Protein mehr synthetisieren. E1B-55kDa ist ein multifunktionales Protein, das unter anderem den Abbau von zellulärem p53, einem in Tumorzellen häufig mutierten Tumorsuppressor, vermittelt. Davon ausgehend, dass die Beseitigung von p53 für eine produktive Adenovirusinfektion essentiell ist, sollte sich die Virusmutante nur noch in p53-mutierten oder -deletierten Zellen, also einer Vielzahl von Tumorzellen, replizieren können (Bischoff et al., 1996). Obwohl die klinischen Tests erfolgreich verliefen, mehrten sich die Zweifel an der Richtigkeit des postulierten Mechanismus der Tumorspezifität (Dix et al., 2001; Goodrum and Ornelles, 1998; Harada and Berk, 1999; Koch et al., 2001). Die Aufklärung des exakten Mechanismus der tumorspezifischen Replikation von ONYX-015 *in vivo* ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen (Hall et al., 1998; Hann and Balmain, 2003; O'Shea et al., 2005b; Ries et al., 2000).

## 2.5 PKR-sensitive Viren mit Ras-abhängiger Replikation

Neben dem Versuch, p53-abhängig replizierende Viren herzustellen, gibt es natürlich Bestrebungen die Replikationsfähigkeit onkolytischer Viren auch an andere Tumormarker zu koppeln. Ein vielversprechender Ansatz wurde erstmals 1998 von (Strong et al., 1998) für Reoviren vorgestellt. Er beruht auf der schon in Kapitel 2.2 vorgestellten Inhibition der PKR-Aktivität durch aktives Ras. Die Replikation von Reoviren ist besonders PKR-sensitiv, da diese einerseits bereits durch ihr doppelsträngiges RNA-Genom eine starke PKR-Antwort hervorrufen, andererseits aber keinen wirksamen PKR-Antagonismus besitzen. Die Replikationsfähigkeit dieser Viren sollte daher in besonderer Weise von der PKR-inhibierenden Wirkung von aktivem Ras, das in etwa 30 % aller Tumoren vorkommt, abhängig sein (Abb. 5).

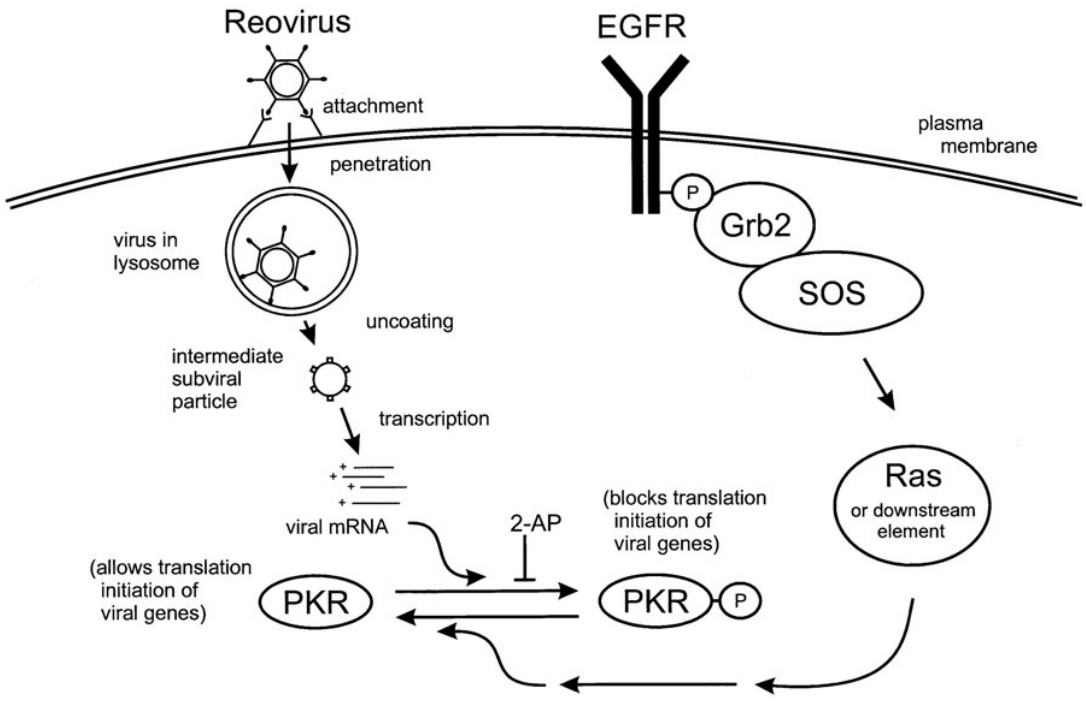



**Abb. 5. Die Ras-abhängige Replikation von Reoviren.** Elemente des aktivierten Ras-Signalwegs können die antivirale Kinase PKR inhibieren bzw. deren Aktivierung verhindern. Da Reoviren keinen natürlichen Antagonisten für die PKR besitzen, hängt ihre Replikation von der Aktivität des Ras-Signalwegs ab. (aus Strong et al., 1998)

Die verbesserte Replikation von Reoviren nach Überexpression von aktivem Ras und in Ras-transformierten Zelllinien sowie Wirksamkeitsstudien in primären Tumorzellkulturen (*ex vivo*) und Xenograft-Modellen (*in vivo*) mit mutiertem Ras bestätigten diese Annahme (Norman et al., 2002; Yang et al., 2003). Mittlerweile werden Reoviren in mehreren Phase I und II-Studien auf ihre Einsetzbarkeit in der Krebstherapie untersucht (Norman and Lee, 2005).

Das Prinzip der Ras-abhängigen Replikation wurde inzwischen auch auf andere potentiell onkolytische Viren übertragen. Dazu zählen sowohl native Viren wie VSV (Balachandran and Barber, 2004; Balachandran et al., 2001), als auch genetisch veränderte Viren mit deletierten PKR-Antagonisten, wie HSV-1 R3616 (Farassati et al., 2001) und 1716 (ΔICP34.5) oder Influenza Virus dNS1 (Bergmann et al., 2001). Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, besitzen die verschiedenen onkolytischen Viren aber alle spezielle Vor- und Nachteile. Während die nativen Reoviren oder VSV normalerweise ein relativ milder Krankheitsverlauf auszeichnet, lassen sie sich bisher genetisch nicht manipulieren. Die biotechnisch zugänglichen Viren, wie HSV oder Influenza, bergen die Gefahr, schwere Krankheitsverläufe auslösen zu können. Adenoviren hingegen vereinen die Vorteile einer geringen Pathogenität, eines gut

charakterisierten und leicht manipulierbaren Genoms sowie außerordentlich guter Handhabbarkeit in Kultur. Die Übertragung des Ras-abhängigen Replikationsmodells auf Adenoviren würde daher nicht nur die Herstellung eines weiteren niedrig-pathogenen, onkolytischen Virus dieser Machart bedeuten. Die gentechnische Zugänglichkeit von Adenoviren böte erstmals die Möglichkeit, ein Ras-abhängig replizierendes Virus mit anderen spezifitäts- oder wirksamkeitssteigernden Merkmalen auszustatten. Die bereits vorhandene, umfassende klinische Erfahrung mit onkolytischen Adenoviren aus den Untersuchungen mit ONYX-015 würde zudem den Eintritt solcher onkolytischen Viren in klinische Studien erleichtern.

**Tabelle 1. Vor- und Nachteile verschiedener, onkolytischer Viren.** (nach Chiocca, 2002)

| Virus | Onkolyt. Stämme | Vorteile | Nachteile |
|---|---|---|---|
| HSV-1 | gentechnisch hergestellt | Kann einfach genetisch modifiziert werden; Erfahrung aus klinischen Studien; wirksame Medikamente gegen ungewollte Virusreplikation | Nebeneffekte u.a. ernsthafter Krankheitsverlauf; unbekannte Funktion vieler HSV1-Gene |
| Adenovirus | gentechnisch hergestellt | Kann genetisch modifiziert werden; Erfahrung aus klinischen Studien; gute Kenntnis viraler Proteinfunktionen; verursacht nur milde Krankeitssymptome | Replikation nur schwer zu verhindern |
| Reovirus | natürlich vorkommend | Verursacht nur milde Krankeitssymptome; gute Kenntnis der viralen Gene | Kann nicht einfach genetisch modifiziert werden; keine Erfahrung in klinischen Studien; ungewollte Replikation kann nicht einfach abgestellt werden |
| Vaccinia Virus | gentechnisch hergestellt | Kann genetisch modifiziert werden; Erfahrung aus klinischen Studien | ungewollte Replikation kann nicht einfach abgestellt werden; keine Erfahrung aus klinischen Studien; unbekannte Funktion vieler Virusgene; Nebeneffekte ggf. schwerer oder tödlicher Krankheitsverlauf |
| VSV | natürlich vorkommend | Verursacht nur milde Krankeitssymptome; gute Kenntnis der viralen Gene | Kann nicht einfach genetisch modifiziert werden; keine Erfahrung in klinischen Studien; ungewollte Replikation kann nicht einfach abgestellt werden |
| Poliovirus | gentechnisch hergestellt | gute Kenntnis der viralen Gene | Kann nicht einfach genetisch modifiziert werden; keine Erfahrung in klinischen Studien; ungewollte Replikation kann nicht einfach abgestellt werden; kann schwere Krankheit verursachen |

## 2.6 Fragestellung

Vor einiger Zeit beschrieben Mundschau und Faller (1992) die Beeinträchtigung der zentralen Kinase der zellulären Virusabwehr, der PKR, durch aktiviertes Ras. Obwohl bis heute die molekularen Grundlagen dieser Wechselwirkung unbekannt sind, diente diese Beobachtung als Grundlage für ein neues Konzept der Virus-vermittelten Onkolyse: aktiviertes Ras, wie es in bis zu 30% aller Tumoren auftritt (Bos, 1989), ermöglicht die selektive Replikation PKR-sensitiver Viren in Tumorzellen, während das umliegende Gewebe verschont bleibt. Nach ersten vielversprechenden Ansätzen mit Reoviren (Strong et al., 1998) und Vesikulären Stomatitis Viren (VSV) (Balachandran and Barber, 2004; Balachandran et al., 2001), die eine natürliche Sensitivität gegenüber der PKR-Wirkung besitzen, folgten Versuche mit PKR-sensitiven Virusmutanten, wie z. B. Influenza Virus dNS1 (Bergmann et al., 2001) und Herpes Simplex Virus R3616 (Farassati et al., 2001). Nachteile all dieser onkolytischen Viren sind zum einen die schlechte genetische Manipulierbarkeit und zum anderen die hohe Pathogenität der Parentalviren (Chiocca, 2002).

Ziel dieser Doktorarbeit war daher die Übertragung dieses onkolytischen Prinzips auf Adenoviren. Durch Deletion der Gene der VA-RNAs, der adenoviralen Inhibitoren der PKR, sollten PKR-sensitive Virusmutanten geschaffen werden. Danach sollte die Abhängigkeit der Replikation der verschiedenen Virusmutanten von aktiviertem Ras überprüft werden. Besonderes Augenmerk fiel hier auf die Rolle der zweiten, bisher kaum charakterisierten VA-RNA.

Obwohl das Prinzip der Ras-abhängigen Replikation bereits auf viele verschiedene Viren übertragen werden konnte, bleibt der genaue Mechanismus der PKR-Inhibition durch aktiviertes Ras weiterhin unklar. Weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war deshalb die Untersuchung der mechanistischen Grundlagen der Ras-abhängigen Replikation PKR-sensitiver Viren am Beispiel der zu verwendenden Adenovirusmutanten. Wesentlich hierfür war u. a. die Untersuchung der Rolle Ras-abhängiger Signalwege bei der Adenovirusinfektion.

# 3 Material

## 3.1 Chemikalien

| | |
|---|---|
| 1, 4 Diazabicyclo-[2.2.2]-oktan (DABCO) | Sigma |
| 1, 4 Dithiothreit (DTT) | Sigma |
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%, 29:1) | Bio-Rad |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Bio-Rad |
| Blocking Reagenz | Roche |
| Bromphenolblau | Serva |
| Cycloheximid | Sigma |
| DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenyindol) | Sigma |
| Desoxycholat (DOC) | Sigma |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Serva |
| DNA-Größenstandard „Gene ruler" | MBI Fermentas |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Roth |
| Fluoprep | bioMerieux |
| Iodacetamid | Sigma |
| Magermilchpulver | Töpfer |
| N, N, N´,N´- Tetramethylendiamin (TEMED) | Bio-Rad |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck Eurolab GmbH |
| Polyinosin-polycytosinsäure (polyIC) | Sigma |
| Protein-Größenstandard BenchMark Prestained | Invitrogen |
| Sonicated Salmon Sperm DNA (Lachssperm-DNA) | Stratagene |
| Trasylol | Bayer |
| Triton X-100 | Sigma |
| Trizol (-LS) | Invitrogen |
| Tween 20 | Serva |

## 3.2 Enzyme

| | |
|---|---|
| AdvanTaq DNA Polymerase | Clontech |
| Alkalische Phosphatase (from calf instestine) | Roche |
| Expand HIFI Polymerase System | Roche |
| Pfu turbo® [2,5U/ml] | Stratagene |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs |
| T4 DNA-Ligase [30 Weiss units/µl] | MBI Fermentas |

## 3.3 Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|---|
| 12-Loch Zellkulturplatten | Greiner |
| 6-Loch Zellkulturplatten | Greiner |
| BIOMAX MR Röntgenfilm | Kodak |
| Gel-Blotting-Papier GB002 (Whatman-Papier) | Schleicher & Schuell |
| Glaskapillaren für Light Cycler | Roche |
| Kammer-Objektträger LabTEK® | Nalge Nunc Int. |
| Nylon-Transfer Membran Hybond-N+ | Amersham |
| PCR-Reaktiongefäße MicroAmp® | PE Biosystems |
| PROTRAN$^{R}$ Nitrocellulose Transfer Membrane | Schleicher & Schuell |
| Reaktionsgefäße (2 ml / 1,5 ml / 0,5 ml) | Eppendorf |
| Zellkulturflaschen (162 $cm^2$, 75 $cm^2$, 30 $cm^2$) | Greiner |
| Zellschaber | Greiner |
| Zentrifugeneinsätze für SW41 | Beckman |

### 3.4 Kits

| | |
|---|---|
| ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit | Perkin Elmer |
| BCA Protein Assay | Pierce |
| BIORAD Protein Assay | Bio-Rad |
| DIG Detection Kit | Roche |
| DIG RNA Labeling Kit | Roche |
| E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II | peqlab |
| Lipofectamine 2000 | Invitrogen |
| Luciferase Assay Kit | Promega |
| QIAamp® DNA Mini Kit | Qiagen |
| Superscript™ II RT | GibcoBRL |
| SuperSignal® West Dura | Pierce |

### 3.5 Antikörper

| Primärantikörper | Herkunft | Hersteller |
|---|---|---|
| α-Ad2 E1A | Mouse monoclonal | Calbiochem |
| α-AKT | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |
| α-beta-actin | Mouse monoclonal | Abcam |
| α-beta-actin | Rabbit polyclonal | Abcam |
| α-beta-tubulin | Rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| α-E2A (B6-6) | Mouse monoclonal | Jane Flint, Princeton University |
| α-eIF2α | Mouse monoclonal | Biosource |
| α-eIF2B(γ) | Mouse monoclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| α-eIF2B(ε) | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |
| α-eIF4E | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |
| α-ERK | Rabbit polyclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| α-Fiber | Mouse monoclonal | Neomarkers |
| α-laminB1 | Mouse monoclonal | Zymed Laboratories |
| α-myc (9E10) | Mouse monoclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| α-Nucleophosmin (B23) | Mouse monoclonal | Zymed Laboratories |
| α-p38 | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |
| α-P-AKT [Ser473] | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |
| α-PARP1 | Mouse monoclonal | Oncogene/Calbiochem |
| α-P-eEF2 [Thr56] | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |
| α-P-eIF2α [Ser52] | Mouse monoclonal | Biosource |
| α-P-eIF4E [Ser209] | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |
| α-P-ERK [Tyr204] | Mouse monoclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| α-P-MNK1 [Thr197/202] | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |
| α-P-p38 [Thr180/Tyr182] | Mouse monoclonal | Cell Signaling Technology |
| α-P-S6 [Ser235/236] | Rabbit polyclonal | Cell Signaling Technology |

**Sekundärantikörper**

| | |
|---|---|
| Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) | Jackson ImmunoResearch |
| Peroxidase-conjugated AfffiniPure F(ab′)$_2$ Fragment Donkey Anti-Rabbit | Jackson ImmunoResearch |
| Alexa Fluor® 594 goat anti-mouse IgG (H+L) | Molecular Probes |
| AlexaFluor® 680 goat anti-mouse IgG (H+L) | Molecular Probes |
| AlexaFluor® 680 goat anti-rabbit IgG (H+L) | Molecular Probes |
| IRdye™ 800 goat anti-mouse IgG (H+L) | Rockland |
| IRdye™ 800 goat anti-rabbit IgG (H+L) | Rockland |

### 3.6 Oligonukleotide

alle Primer synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg; (Orientierung 5′→3′)

| | |
|---|---|
| E1A 12SRNA for | GCG GTT TCG CAG ATT TTT CCC G |
| E1A 12SRNA rev | GCA GGC GCC ATT TTA GGA C |
| E1A 12SRNA RT | GGT GAT GTC GGG CGT CTC AGG |
| PanE1AcDNAfor | GCC ACG GAG GTG TTA CC |
| Ad5 L5 hin | GCG GTT GAG GAC AAA CTC TTC GCG G |
| Ad5 L5 rück | GCG CTG CAG ATG CTT CAA CAG CAC G |
| Ad5 L5 RT | GGC AAG CAC CTC TGG CAC GGC AAA TAC GG |
| cKiRasfor | TAA GCC CTG CTG AAA ATG ACT G |
| cKiRasrev | CTG TAT CAA AGA ATG GTC CTG C |
| cKiRasbackSeq | GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC |
| cN-Ras for | TTC TTA CAG AAA ACA ATG G |
| cN-Ras rev | AAT ATC CGC AAA TGA CTT GC |
| cN-Ras Seq | TGA CTT GCT ATT ATT GAT GG |
| VAI cDNA for | AGC GGG CAC TCT TCC GTG G |
| VAI cDNA rev | GTC TGA CGT CGC ACA CCT GG |
| Northern VAI rev | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG CAC TCC CCC GTT GTC TGA CG |
| VAII cDNA for | GGC TCG CTC CCT GTA GCC GG |
| Northern VAII rev | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCT CGT CCC TGT TTC CGG AGG |
| VA SwaI for | GCT CCC TGT AGC CGG AGG GTT ATT TAA ATA GGG TGG AGT CG |
| VA SwaI rev | CGA CTC AAC CCT ATT TAA ATA ACC CTC CGG CTA CAG GAG C |
| VA331SwaIQuikfor | CGC AAG GGT ATC ATG GAT TTA AAT CGC CGT GAT CCA TGC |
| VA331SwaIQuikrev | GCA TGG ATC ACG GCG ATT TAA ATC CAT GAT ACC CTT GCG |
| Amp SwaI for | ACT GAC TGA TTT AAA TAC AGG GCG CGT CAG GTG GCA C |
| Amp SwaI rev | ACT GAC TGA TTT AAA TGG GTC TGA CGC TCA GTG GAA CG |
| Ad5VARNASeq | ACC TGG ACA TCC AGG TGA TG |
| Ad5VAII backSeq | CCT GCA TGT CTG CCG CTG C |

### 3.7 Zellkulturmedien & Zusätze

| | |
|---|---|
| Ciprofloxacin (Ciprobay®) | Bayer |
| Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) | GibcoBRL |
| RPMI1640 Medium | GibcoBRL |
| McCoy's Medium | GibcoBRL |
| Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) | GibcoBRL |
| Interferon $\alpha$-LE [ad 1000 U/ml] | Sigma |
| L-Glutamin | GibcoBRL |
| Penicillin/Streptavidin | GibcoBRL |
| Tetracyclin | Sigma |
| Trypsin/EDTA | GibcoBRL |

| Vollmedium: | | |
|---|---|---|
| | 10 µg/ml | Ciprobay |
| | 50 U/ml | Penicillin |
| | 50 µg/ml | Streptavidin |
| | 2 µg/ml | Tetracyclin |
| | 10 % | FCS |
| | 200 µM | L-Glutamin |

**Kinase Inhibitoren**

| | |
|---|---|
| CGP 37580 | Dr. Hermann Gram, Novartis |
| LY 294002 | Calbiochem |
| MEK1/2 inhibitor (SL327) | Calbiochem |
| PD 098059 | Calbiochem |
| U0126 | Promega |

| | |
|---|---|
| EZ Mix™ LB Agar | Sigma |
| Ampicillin [ad 200 µg/ml] | Sigma |
| Kanamycin [ad 25 µg/ml] | Sigma |

### 3.8 Bakterien, Viren & eukaryotische Zellen

**Bakterien**

| | |
|---|---|
| *Escherichia coli* DH 10 B „ElectroMax“ | GibcoBRL |
| *E. coli* BJ5183 | Stratagene |

**Humane Zellen**

| | |
|---|---|
| Humane Nasenepithelzellen (HNE) | PromoCell |
| MRC5 | EACC |
| BJ-ET | (Voorhoeve and Agami, 2003) |
| HT-29 | DSMZ |
| NCI-H125 | ATCC |
| NCI-H322 | ATCC |
| NCI-H1299 | ATCC |
| NCI-H1373 | ATCC |
| NCI-H2347 | ATCC |
| A549 | ATCC |
| HCT116 | ATCC |
| HepG2 | ATCC |
| HT-1080 DSMZ | DSMZ |
| HT-1080 6TG | Dr. E. Stanbridge, UCI, USA |
| MCH603c8 | Dr. E. Stanbridge, UCI, USA |
| PANC-1 | DSMZ |
| Shep | ATCC |

**Viren**

| | |
|---|---|
| Ad 309p | |
| Ad dVAI | |
| Ad dVAII | |
| Ad dVAs | alle selbst hergestellt |

### 3.9 Plasmide&Vektoren

| | |
|---|---|
| pGEMZf7(+) | Promega |
| pAdTrackCMV | Stratagene |

### 3.10 Puffer

| | | |
|---|---|---|
| 6x DNA-Probenpuffer: | 0,25 % | Bromphenolblau (w/v) |
| | 40 % | Sucrose (w/v) |
| | 10 % | Glycerin (w/v) |
| EB-Puffer: | 10 mM | Tris/HCl |
| Formamid/EDTA-Probenpuffer: | Formamid, entionisiert | |
| | 25 mM EDTA (pH 8,0) mit 50 mg/ml Dextranblau im Verhältnis 5:1 Formamid/EDTA+Dextranblau | |
| 6x Laemmli-Puffer: | 0,35 M | Tris pH6,8 |
| | 30 % | Glycerin (v/v) |
| | 10 % | SDS (w/v) |
| | 9,3 % | Dithiothreit (w/v) |
| | 0,015 % | Bromphenolblau (w/v) |
| 10x Laufpuffer für Proteingele: | 0,1 % | SDS |
| | 25 mM | Tris |
| | 192 mM | Glycin |
| Northern Blot Puffer | | |
| Northern-Waschpuffer | 0,1x | SSC |
| | 0,1 % | SDS |
| Collins-Hybridisierungslösung (für Nortern Blot) | 1x | SSC |
| | 0,1 % | N-lauroylsarcosine |
| | 0,02 % | SDS |
| | 1 % | Blocking Reagenz (Roche) |
| Northern-Puffer 1 (pH7,5) | 0,1 M | Maleinsäure |
| | 0,15 M | NaCl |
| Northern-Puffer 3 (pH 9,5) | 0,1 M | Tris-HCl |
| | 0,1 M | NaCl |
| | 50 mM | $MgCl_2$ |

| | | |
|---|---|---|
| Hypotonischer Lysepuffer | 10 mM | Tris-HCl (pH7,5) |
| | 10 mM | KCl |
| | 1,5 mM | $MgCl_2$ |
| PBS (Phosphate buffered saline): | 236,9 mM | NaCl |
| | 2,7 mM | KCl |
| | 8,1 mM | $Na_2HPO_4$ |
| | 1,1 mM | $MgCl_2$ |
| | 1,5 mM | $KH_2PO_4$ |
| | 1,2 mM | $CaCl_2$ |

$PBS^{deficient}$: Zusammensetzung wie PBS, jedoch ohne $MgCl_2$ und $CaCl_2$

| | | |
|---|---|---|
| RIPA-Puffer: | 0,1 % | Triton X-100 (v/v) |
| | 0,1 % | Desoxycholat, DOC (v/v) |
| | 0,1 % | SDS (w/v) |
| | 2 mM | Tris/HCl pH 8,5 |
| | 9 mM | NaCl |
| | 18,5 % | Iodacetamid |
| | 1 mM | EDTA |
| | 1,4 % | Trasylol |
| SSC-Puffer (pH7,0) (20x) | 3 M | NaCl |
| | 0,3 M | Natriumcitrat |
| SSPE-Puffer (pH7,4) (20x) | 3 M | NaCl |
| | 0,2 M | $NaH_2PO_4$ |
| | 20 mM | EDTA |
| 50x TAE-Puffer: | 2 M | Tris |
| | 1 M | Natriumacetat |
| | 0,1 M | EDTA |
| 10x TBE-Puffer: | 40 mM | Tris |
| | 0,05 mM | EDTA |
| | 0,89 M | Borsäure |

1 M Tris-Puffer (pH 6,8)
1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)

### 3.11 Geräte

| | |
|---|---|
| ABI Prism™ 377 DNA Sequencer | Perkin Elmer |
| Brutschrank „Steri-Cult 200“ | Forma Scientific, Inc. |
| Entwickler-Maschine „Gevamatic 60“ | Agfa-Gevaert |
| Gene Pulser II (Elektroporation) | Bio-Rad |
| GeneQuant II | Pharmacia Biotech |
| Kamera „Gel Cam DS H7) | Polaroid |
| Kamera „Land Camera MP4“ | Polaroid |
| Light Cycler 2.0 | Roche |
| Odyssey Infrared Imaging System | LiCor |
| PCR-Cycler „Gene Amp PCR System 2400“ | Perkin Elmer |
| PCR-Cycler „PCR Sprint“ | Hybaid |

| | |
|---|---|
| PCR-Cycler „Primus“ | MWG Biotech |
| PosiBlot 30-30 Pressure Blotter | Stratagene |
| Quarzküvetten (Suprasil$^{R}$) | Hellma |
| Schwenkbrett „WS-15“ | von Keutz |
| Spektrophotometer „DU-40“ | Beckman |
| Sterilbank | Prettl |
| Stromquelle EC 250-90 | EC-Apparatus Corporation |
| Taumler HS 250 basic | IKA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf |
| Tischzentrifuge 2043 Mikroliter | Hettich |
| Tischzentrifuge MIKRO 22R | Hettich |
| Ultrazentrifuge L7-55 + Rotor SW41 | Beckman |
| UV-Schirm „Chroma 41“ | Vetter GmbH |
| Vortexer | Merck |
| Western Blot-Kammer | Bio-Rad |
| Zählkammer (Neubauer) | la fontaine |
| Zentrifuge „Megafuge 1,0R“ | Heraeus |
| Gel Doc™ 2000 | BioRad |
| ABI Prism® 3100 | Applied Biosystems |

# 4 Methoden

## 4.1 Zellbiologische und virologische Methoden

### 4.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgt in adhärenter Zellkultur in Kunststoff-Zellkulturflaschen verschiedener Größen. Das verwendete Standardmedium ist DMEM. Abweichend davon wachsen HNE in eigenem Spezialmedium, HT-29 und HCT-116 in McCoy's 5A, NCI-H125, NCI-322, NCI-H1373 und NCI-H2347 in RPMI1640-Medium. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5 % $CO_2$.

Die Behandlung der Zellen erfolgt an einer Sterilbank, um Kontaminationen zu vermeiden. Zum Passagieren wird zunächst das Kulturmedium entfernt, und die Zellen werden mit 10 ml $PBS^{def}$ gewaschen, um Zelltrümmer und zweiwertige Kationen weitestgehend zu entfernen. Dann werden die Zellen mit Trypsin/EDTA überschichtet (ca. 30 µl/$cm^2$) und kurz inkubiert. Durch Zugabe der gleichen Menge Medium mit FCS wird das Trypsin/EDTA inaktiviert. Die Zellen werden durch leichtes Klopfen vollständig vom Gefäßboden gelöst, ggf. mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt, entsprechend verdünnt und in neuen Kulturgefäßen mit frischem Medium ausgesät.

### 4.1.2 Präparation einer Virussuspension

Zur Präparation einer Virussuspension werden infizierte Zellen zum geeigneten Zeitpunkt mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst. Die Zellsuspension wird für 10 min. bei 3.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet in sterilem PBS suspendiert. Die Zellen werden durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen (flüssiger Stickstoff / Heizblock) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 1 min. bei 14.000 rpm werden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wird in ein steriles Reaktionsgefäß transferiert, ggf. aliquotiert, und bei –70°C gelagert.

### 4.1.3 Titration einer Virussuspension

Zur Bestimmung des Titers einer Virussuspension werden am Vortag H1299-Zellen auf Kammer-Objektträgern zu 50.000 Zellen/Kammer ausgesät (4.1.1).

Zur Infektion der Zellen wird die Virussuspension zunächst 1:100 und 1:10.000 in PBS verdünnt. Die Zellen in den vier Kammern werden mit je 1 µl und 10 µl der zwei Verdünnungsstufen infiziert (4.1.5). Die Objektträger werden eine Stunde lang im Brutschrank auf dem Schwenkbrett und dann stehend inkubiert. Nach ca. 18 Stunden werden die infizierten Zellen durch Immunfluoreszenzfärbung gegen das adenovirale E2A-

Protein sichtbar gemacht und ihr Anteil an der Gesamtzellzahl (Färbung der Zellkerne mit DAPI) ermittelt. Anhand dieses Quotienten lässt sich die Konzentration der infektiösen Einheiten (fluorescence forming units, f. f. u.) in der untersuchten Virussuspension errechnen.

### 4.1.4 Immunfluoreszenz

Zelluläre und virale Antigene können in ihrer intrazellulären Lokalisation durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Im Kontext dieser Arbeit wird die Immunfluoreszenz lediglich dazu verwendet, infizierte Zellen durch Färbung gegen das virale E2A-Protein sichtbar zu machen.

Zur Färbung infizierter Zellen auf Kammer-Objektträgern wird das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und nach folgendem Protokoll behandelt (jeweils 300 µl/Kammer):

| | **Inkubationszeit** |
|---|---|
| + 4% Paraformaldehyd (in $PBS^{def.}$) | 20 min. |
| 2x mit $PBS^{++}$ waschen | 2x kurz |
| + 0,2% Triton X100 (in $PBS^{++}$) | 20 min. |
| 4x mit $PBS^{++}$ waschen | 4x kurz |
| + 10% FCS (in $PBS^{++}$) | 10 min. |
| + 1.Antikörper (B6-8, anti-E2A) [1:20 in 10%FCS/$PBS^{++}$] | 50 min. |
| 3x mit $PBS^{++}$ waschen | 2x kurz, 1x 5 min. |
| + 2.Antikörper (Alexa-rot anti-mouse) [1:500 in 10%FCS/$PBS^{++}$] | 20 min. |
| 3x mit $PBS^{++}$ waschen | 2x kurz, 1x 5 min. |
| + DAPI (1:10.000 in $PBS^{++}$) | >2 min. |
| 1x mit $PBS^{++}$ waschen | Kurz |

Die Kammern werden vom Objektträger entfernt und die Zellen mit Fluoprep (+2,5% DABCO) eingedeckelt.

### 4.1.5 Infektion von Zellen

Die Infektion von Zellen erfolgt normalerweise in DMEM (ohne Zusätze), um die Zahl der Proteine, die um Bindungsstellen auf der Zelloberfläche kompetitieren, gering zu halten. Das Verhältnis von Viren zu Zellen wird als „multiplicity of infection“ (M. O. I.) angegeben.

Zur Infektion von Zellen in 6-Loch-Platten werden am Vortag 200.000 Zellen/Loch augesät (4.1.1). Am Tag der Infektion wird zunächst das Medium entfernt, und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit $6x10^5$ i.u. in 1 ml DMEM (ohne Zusätze) pro Loch (M. O. I. = 3) für 1h im Brutschrank auf einem Schwenkbrett inkubiert. Danach wird das Virusmedium entfernt und gegen DMEM (voll) ersetzt. Die Zellen werden nun stehend weiter inkubiert. Für eine anschließende RNA-, bzw. Proteinisolierung werden die Zellen nach 24 Stunden geerntet.

Zur Aufnahme von Replikationskurven (Kap. 5.2) wurden in 12-Loch-Platten 100.000 Zellen/Loch mit 50.000 i.u. infiziert (M. O. I. = 0,5). Das Medium wurde täglich erneuert. Die Ernte erfolgt in der Regel nach 72 Stunden.

Die Vermehrung der Adenoviren erfolgt in H1299-Zellen. Dazu wird zunächst eine mittlere Kulturflasche ($75cm^2$) mit ca. 80% konfluentem Zellrasen mit einer M. O. I. von ungefähr 3 infiziert. Dies kann in Vollmedium erfolgen. Sobald die Zellen einen zytopathischen Effekt zeigen, werden sie geerntet und aufgeschlossen. Mit der erhaltenen Viruspräparation können nun mehrere große Flaschen infiziert werden. Nach Auftreten des zytopathischen Effekts wird aus allen Ansätzen eine Virussuspension hergestellt (4.1.2).

Die Infektion von H1299-Zellen zur anschließenden Titration erfolgt durch Injektion der verschiedenen Virusverdünnungen (4.1.3) in das Kulturmedium.

## 4.2 Methoden zur Klonierung

### 4.2.1 Plasmidpräparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wird das Plasmid Miniprep Kit II (peqlab) verwendet. Zugrundeliegendes Prinzip ist wie bei anderen handelsüblichen Kits die alkalische Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von der Reinigung der DNA über eine Silica-Säule. Die DNA wird in der Regel mit 50 µl EB-Puffer eluiert.
Zur Präparation von DNA in kleinem Maßstab ist es ausreichend, 1-2 ml einer Übernachtkultur einzusetzen. Zur Präparation in großem Maßstab empfiehlt es sich, 30 ml und mehr einzusetzen, wobei die Volumina der Reagenzien wie im Protokoll beschrieben angepasst werden müssen. Die Zahl der Säulchen muss allerdings nicht proportional erhöht werden, da sie aufgrund ihrer hohen Kapazität (75 µg DNA) mehrfach beladen werden können.

### 4.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration von Lösungen erfolgt im Photometer [Gene Quant II, Pharmacia Biotech] durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Verwendung von Quarzküvetten. Bei dieser Wellenlänge sind Absorption und Nukleinsäurekonzentration der Lösung im linearen Bereich der Absorptionskurve direkt proportional. Die Lösung wird mit $dH_2O$ verdünnt.

Die Konzentration berechnet sich nach folgener Formel:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration} = Abs_{260} \times \text{Faktor} \times \text{Verdünnung}$$

Dabei gelten folgende Faktoren:

| | |
|---|---|
| dsDNA: | 50 µg/ml |
| ss DNA und RNA: | 40 µg/ml |
| ss Oligonukleotide: | 20 µg/ml |

Zur Bestimmung der Reinheit der untersuchten Lösung dient der Quotient aus $Abs_{260}/Abs_{280}$. Saubere Nukleinsäurelösungen zeigen einen Quotienten zwischen 1,8 und 2,0. Kontaminationen mit Proteinen ergeben niedrigere, solche mit Phenol höhere Werte.

### 4.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

DNA und RNA werden unter nativen Bedingungen in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt. Der Größe der aufzutrennenden Moleküle entsprechend werden 0,8-2%ige Gele verwendet.
Die Agarose wird in 1x TAE-Puffer gelöst, nach dem Aufkochen mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in Gelschlitten für Horizontalgele gegossen. Dabei werden 8-12zähnige Kämme verwendet. Die Proben werden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgt in 1x TAE-Puffer bei 80-130V und maximaler Stromstärke. Anschließend können die Nukleinsäuren im UV-Licht sichtbar gemacht und die Ergebnisse im Geldokumentationssystem digitalisiert werden.

### 4.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion dient der Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen. Dabei wird die Lösung zunächst mit einem Volumen Phenol (pH 8,0)

und dann mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1, v/v) ausgeschüttelt. Dazwischen wird jeweils zentrifugiert und die obere, wässrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Gefäss überführt. Die Proteine werden denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase oder der Interphase. Die in der gereinigten Lösung verbliebenen Nukleinsäuren werden anschließend in einer Ethanolfällung (4.2.5) präzipitiert.

### 4.2.5 Ethanolfällung

DNA wird aus wässriger Lösung mittels Ethanolfällung präzipitiert. Dem Ansatz wird Glykogen hinzugefügt, um das Pellet besser sichtbar zu machen.

| | | |
|---|---|---|
| Ansatz: | 1 Vol. | DNA-Lösung |
| | 1 µl | Glycogen [20 µg/µl] |
| | 0,1 Vol. | 3M Natriumacetatlösung, pH 5,2 |
| | 2,5 Vol. | 100% Ethanol (4°C) |

Das Präzipitat wird durch Zentrifugation für 15 min. bei 14.000 rpm und 4°C pelletiert. Nach einem Waschschritt mit 70 % Ethanol wird das Pellet kurz an der Luft getrocknet und anschließend in einem geeigneten Puffer gelöst.

### 4.2.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die DNA wird im Agarose-Gel (4.2.3) aufgetrennt. Das Gel wird anschließend auf einem UV-Schirm betrachtet und die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dabei muss langwelliges UV-Licht (304 nm) verwendet werden, um Schädigungen der DNA durch die UV-Bestrahlung zu vermeiden. Der Agarose-Block wird in ein kleines Eppendorf-Gefäß (0,5 ml) transferiert, welches zuvor am Boden mit einer Kanüle durchstochen wurde. Dieses wird in ein großes Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) gestellt. Bei der anschließenden Zentrifugation wird die Agarose beim Durchtritt durch das kleine Loch zerkleinert und im großen Gefäß aufgefangen. Nun werden 2 Volumen Phenol zugesetzt. Der Ansatz wird 1 min. lang auf dem Vortex-Gerät gut gemischt und dann sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 30 min bei 14.000 rpm und 4°C. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen und einer Phenol/Chloroform-Extraktion (4.2.4) mit anschließender Ethanol-Fällung (4.2.5) unterzogen.

### 4.2.7 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen ist eine schnelle und einfache Methode zur Überprüfung oder Modifizierung von Plasmiden während der Herstellung neuer Vektoren.
Ein analytischer Ansatz dient der schnellen Überprüfung von Plasmiden. Der komplette Ansatz kann nach Inkubation und Zugabe von 2 µl DNA-Probenpuffer (6x) direkt im Agarose-Gel (4.2.3) aufgetrennt werden.
Der präparative Ansatz dient der Herstellung geeigneter Fragmente bei der Klonierung. Unter Umständen muss die DNA nach der Inkubation im Agarose-Gel (4.2.3) aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus der Agarose extrahiert werden (4.2.6).

| | | |
|---|---|---|
| Analytischer Ansatz: | 7 µl | Plasmid-DNA aus MiniPrep (≅ 1-2 µg DNA) |
| | (1 µl | BSA (bovine serum albumine)) |
| | 1 µl | 10x Puffer |
| | 1 µl | Restriktionsendonuklease(n) |
| | ad 10 µl | $dH_2O$ |

| | | |
|---|---|---|
| Präparativer Ansatz: | 10 µg | Plasmid-DNA |
| | (10 µl | BSA) |
| | 10 µl | 10x Puffer |
| | 10 µl | Restriktionsendonuklease(n) |
| | ad 100 µl | $dH_2O$ |

Die Resriktionsendonukleasen werden vom Hersteller mit geeignetem 10x Puffer und ggf. mit BSA geliefert, das zur Stabilisierung der Enzyme dient. Die Kombination verschiedener Enzyme ist i. A. möglich. Dabei verweist der Hersteller auf Tabellen, aus denen die geeigneten Bedingungen zu entnehmen sind. Besitzen zwei Enzyme verschiedene Temperaturoptima, muss die Behandlung der DNA mit ihnen sequenziell erfolgen.

### 4.2.8 Auffüllung nicht kompatibler, überhängender Enden

Ist es aus technischen Gründen nicht möglich, zwei zu verbindende DNA-Moleküle so mit Restriktionsendonukleasen zu behandeln, dass kompatible, überhängende Enden entstehen, kann man die einzelsträngigen Enden mit Nukleotiden auffüllen und die stumpfen Enden (blunt ends) miteinander ligieren.

| | | |
|---|---|---|
| Ansatz: | 44 µl | gereinigte DNA in EB-Puffer (nach Phenol/Chloroform-Extraktion (4.2.4)) |
| | 5 µl | 10x Pfu-Puffer |
| | 1 µl | dNTP-Mix [je 20mM] |
| | 1 µl | Pfu-Polymerase [2,5 U/ µl] |

Inkubation 30 min. bei 70°C.

### 4.2.9 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Zur Vermeidung einer Religation oder Oligomerisierung von Vektoren, die nach Behandlung mit Restriktionsendonukleasen kompatible Enden besitzen, werden die 5‘-Enden der linearisierten Plasmide durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase, CIP) dephosphoryliert. Dazu werden dem Restriktionsansatz nach 1 Stunde Inkubation 2 µl CIP (10 U/µl) zugesetzt.
Der Ansatz wird für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert und dann analog zur restriktionsverdauten Insert-DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion von Proteinbestandteilen befreit.

### 4.2.10 Ligation

DNA-Ligasen verknüpfen freie 5´-Phosphatgruppen und 3´-OH-Gruppen von DNA-Molekülen durch Bildung einer Phosphodiesterbindung unter Verbrauch von ATP. Auf diese Weise kann z.B. ein zusätzlicher DNA-Abschnitt in einen vorhandenen Vektor eingebracht werden. Dabei ist es vorteilhaft, das molare Verhältnis der verschiedenen DNA-Moleküle zu Gunsten des Inserts zu verschieben.

| | | |
|---|---|---|
| Ansatz: | 3 µl | Insert-DNA (ca. 1,5 µg) |
| | 0,5 µl | Vektor-DNA (ca. 0,3 µg) |
| | 0,5 µl | ATP [100µM] |
| | 0,5 µl | T4-DNA-Ligase [30 Weiss units/µl] |
| | 0,5 µl | 10x Ligationspuffer |
| | 0,5 µl | $dH_2O$ |

Um nachträglich beim Auszählen der erhaltenen Kolonien das Verhältnis von religierten Vektoren zu ligierten Plasmiden abschätzen zu können, wird parallel ein Kontrollansatz mitgeführt, in dem lediglich die Insert-DNA durch $dH_2O$ ersetzt ist. Die Ansätze werden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

### 4.2.11 Chemische Transformation

Die Einbringung von DNA in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Zwei gängige Methoden sind die chemische Transformation und die Elektroporation (4.2.12). In beiden Fällen sind speziell kompetente Bakterien notwendig, deren Zellwand unter bestimmten Umständen für DNA durchlässig wird.
Die Plasmid-DNA (1ng ist schon ausreichend) wird mit 25 µl chemisch kompetenten Bakterien gemischt. Das Gemisch wird 15 Minuten auf Eis vorinkubiert, dann einem Hitzeschock von 45 s bei 42°C unterzogen, auf Eis abgekühlt und auf entsprechend selektiven Agarplatten ausplattiert.

**Herstellung chemisch kompetenter Bakterien**
250 ml LB-Medium wird mit 1ml einer Übernachtkultur DH 10 B Bakterien angeimpft. Sobald die Kultur eine $OD_{590}$ von 0,5 erreicht, wird sie 10 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 5 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 62,5 ml steriler, kalter 0,1M $MgCl_2$-Lösung resuspendiert, 20 Minuten auf Eis gestellt und für 5 Minuten bei 300 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird nun in steriler, kalter 0,1M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und mit 5 ml 80% Glycerin versetzt. Die Bakterien werden aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgt bei –80°C.

### 4.2.12 Elektroporation

7 µl elektrokompetente DH 10 B Bakterien werden mit 0,3 µl DNA (nach Ethanolfällung) gemischt und kurz auf Eis vorgekühlt. Der Ansatz wird in eine ebenfalls vorgekühlte Elektroporationsküvette transferiert. Die Elektroporation erfolgt im Gene Pulser Controller bei 1,7 kV, 200 Ω und 25 µF. Nach erfolgreicher Durchführung (Zeitkonstante >4,5 ms) werden 100 µl LB-Medium zugesetzt und die Bakteriensuspension anschließend auf entsprechend selektiven Agarplatten ausplattiert.

### 4.2.13 Ortsgerichtete Mutagenese (QuikChange-Mutagenese)

Diese Methode erlaubt es, gezielt Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen in Plasmid-DNA einzubringen. Dies geschieht durch eine Polymerase-Reaktion mit speziell konstruierten Primern und dem zu verändernden Plasmid als Templat. Die Primer enthalten die gewünschte Mutation flankiert von 10-15 unveränderten Nukleotiden. Um die spätere Selektion mutierter Klone zu erleichtern, kann durch Einführung von stillen Mutationen eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle geschaffen werden.

| | | |
|---|---|---|
| Reaktionsansatz: | 5,0 µl | 10x Puffer |
| | 0,5 µl | dNTP-Mix [je 20mM] |
| | 2,5 µl | Vorwärts-Primer [50 ng/µl] |
| | 2,5 µl | Rückwärts-Primer [50 ng/µl] |
| | 75 ng | DNA-template |
| | 1,0 µl | Pfu turbo-Polymerase [2,5U/µl] |
| | ad 50 µl | $dH_2O$ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Temperaturzyklen: | | 95°C | 30 s | Denaturierung |
| | 20x | 95°C | 30 s | Denaturierung |
| | | 55°C | 1 min. | „Annealing“ |
| | | 68°C | 20 min.* | Elongation |
| | | 4°C | ∞ | Reaktionsende, Lagerung |

* Die Länge des Elongationsschrittes ist von der Größe des zu mutierenden Plasmids abhängig (2 min/1000 bp).

Nach Beendigung des PCR-Programms wird die DNA mit 2 µl *Dpn*I [10U/µl] für 1h bei 37°C verdaut. Diese Restriktionsendonuklease schneidet nur vollständig methylierte DNA, wie sie nach Präparation aus Bakterien vorliegt. Da das Mutageneseprodukt hemimethyliert bzw. unmethyliert vorliegt, wird so das Verhältnis zwischen Ausgangsmaterial und Produkt zugunsten des mutierten Plasmids verschoben. Nach Ethanol-Fällung (4.2.5) erfolgt die Elektroporation (4.2.12) der DNA in Bakterien.

### 4.2.14 Herstellung der VA-RNA-defizienten Adenovirusmutanten

Die Herstellung der Adenovirusmutanten erfolgte in Anlehnung and das von (He et al., 1998) beschriebene Plasmid-gestützte AdEasy-System. Zunächst wurde das Plasmid pAd309 hergestellt, das das gesamte Adenovirus *dl*309-Genom enthält. Dies geschah nach Co-Transfektion eines mit *Pme*I linearisierten pAdTrackCMV-Plasmids mit genomischer *dl*309-DNA durch homologe Rekombination. Das Plasmid pAd309 besitzt folglich eine Expressionskassette für eine Kanamycin-Resistenz (Abb. 6) und wurde durch Elektroporation in *Escherichia coli* - Bakterien des Stammes BJ5183, der besonders hohe Rekombinationsraten aufweist, eingebracht.

Danach wurde zur Herstellung eines Transfervektors die *dl*309-DNA mit *Sna*BI und *Pme*I geschnitten und das 3kb-Fragment, das die kodierende Sequenz der VA-RNA-Gene enthält, über *Sma*I in pGEM7Zf(+) kloniert. In diesem Transfervektor wurde einerseits das BoxB-Element des VA-RNA I-Promotors durch ortsgerichtete Mutagenese mit den Primern

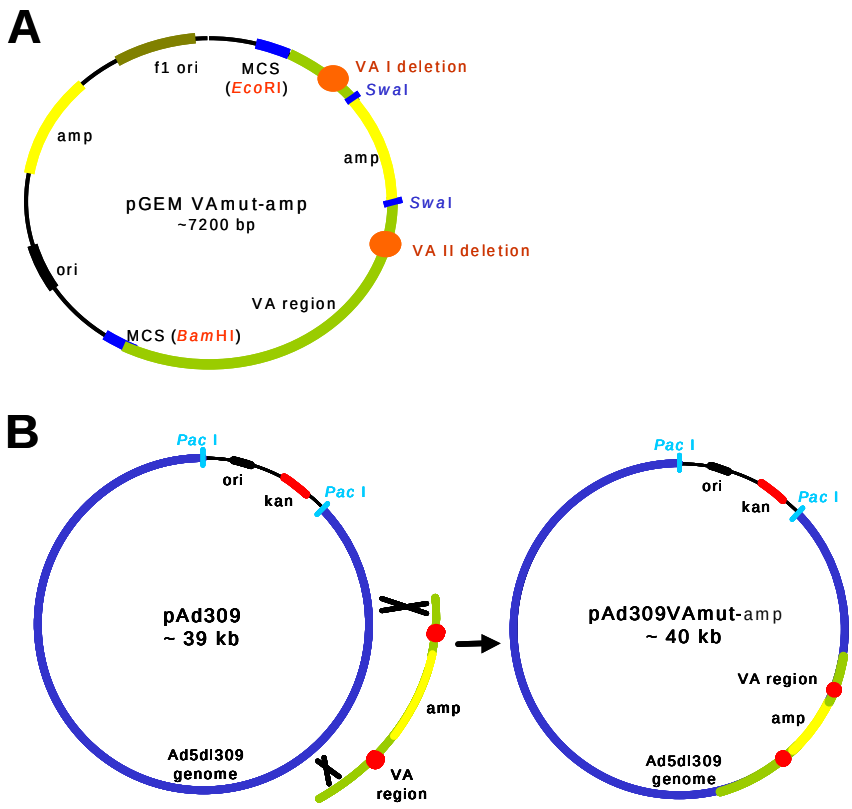



**Abb. 6. Plasmide zur Herstellung der VA-RNA-losen Virusmutanten.** (A) Transfervektor. Der Bereich der genomischen Adenovirus-DNA, der die VA-RNA-Gene beinhaltet, wurde in die MCS von pGEM7Zf(+) kloniert. Die Modifikation der VA-RNA-kodierenden Sequenzen fand im Transfervektor statt. (B) pAd309. Die gesamte genomische DNA des Adenovirus dl309 wurde in pAdTrackCMV eingebracht. Die modifizierten Sequenzbereiche der VA-RNAs wurden aus dem Transfervektor ausgeschnitten und durch homologe Rekombination in E. coli BJ5183 in pAd309 eingeführt.

VA331SwaIQuikfor/rev deletiert und benachbart eine *Swa*I-Schnittstelle eingeführt und andererseits das BoxB-Element des VA-RNA II-Promotors durch Schnitt mit *Ppu*MI und *Rsr*II und anschließender Re-Ligation entfernt und eine benachbarte *Swa*I-Schnittstelle mit den Primern VA SwaI for/rev eingeführt (detaillierte Sequenzinformation in Abb. 7A).

Die Expressionskassette für die Ampicillin-Resistenz von pGEM7Zf(+) wurde mit den Primern Amp SwaI for/rev PCR-amplifiziert und in die neu entstandenen *Swa*I-Schnittstellen der Transfervektoren kloniert, so dass diese nun zwei solche Expressionskassetten besaßen. Die VA-RNA Gene mit den Ampicillin-Resistenzkassetten wurden nun mit *Eco*RI und *Bam*HI aus den Transfervektoren ausgeschnitten und mittels Elektroporation in pAd309-prätransformierte BJ5183-Bakterien eingebracht. Die Doppelselektion für ampicillin- und kanamycinresistente Bakterien lieferte schließlich die Plasmide, die die modifizierten VA-

RNA-Bereiche durch homologe Rekombination aufgenommen hatten. Die Entfernung der Ampicillin-Resistenzkassette durch *Swa*I-Behandlung und Re-Ligation stellte schließlich den genomischen Kontext der VA-RNA-Gene wieder her. Zur Herstellung rekombinanter Viren wurde die genomische Virus-DNA durch *Pac*I-Behandlung aus den Plasmiden herausgeschnitten und mit Lipofectamine 2000 transient in H1299-Zellen transfiziert. Nach 7-10 Tagen war ein zytopathischer Effekt zu beobachten und die entstandenen Viren wurden wie in 4.1.2 beschrieben vermehrt. Die rekombinanten Genomabschnitte wurden durch Sequenzierung und die Wirksamkeit der eingeführten Mutationen mittels Northern Blot-Analyse (Abb. 7B) überprüft.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden mit Nukleinsäuren

### 4.3.1 Transiente Transfektion

Die Transfektion von H1299-Zellen erfolgt mit Lipofectamine 2000. Zur Transfektion von Zellen in 6-Loch-Platten werden am Vortag 200.000 Zellen/Loch ausgesät (4.1.1). Die Transfektion erfolgte mit 2 µg polyIC, 400 µl DMEM (ohne Zusätze) und 4 µl Lipofectamine 2000 nach Vorschrift des Herstellers.

### 4.3.2 DNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung zellulärer wie viraler DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgt mit Hilfe des QIAamp Kits von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.
Zur Gewinnung viraler DNA werden H1299-Zellen mit einer M. O. I. von 10 infiziert (4.1.5) und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dann werden die Zellen geerntet, pelletiert und im Lysepuffer des Kits resuspendiert.

### 4.3.3 Amplifikation von DNA-Genfragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die PCR dient der spezifischen Amplifizierung von DNA-Sequenzen zwischen zwei Oligonukleotid-Fragmenten (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden.
Die Matrizen-DNA („template“) wird zunächst durch hohe Temperatur (>90°C) in ihre Einzelstränge getrennt. Danach erfolgt bei geeigneter Temperatur die Anlagerung („annealing“) der Primer, woraufhin diese durch die eingesetzte DNA-Polymerase verlängert werden („elongation“). Als Matrize dient der an den Primer gebundene Komplementärstrang.

Diese Reaktionssequenz wird zyklisch mehrere Male wiederholt. Die jeweils synthetisierten DNA-Stränge können in der darauffolgenden Runde ihrerseits als Matrize dienen, so dass eine exponentielle Amplifizierung der DNA-Menge erfolgt.
Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA wird das Expand HIFI Polymerase System (Roche) verwendet. Der enthaltene Polymerase-Mix amplifiziert auch große Abschnitte (> 1kb) mit relativ geringer Fehlerrate.

PCR-Ansatz:

| | |
|---|---|
| 5,0 µl | 10x Puffer |
| 0,5 µl | dNTP-Mix [je 20mM] |
| 1,0 µl | Vorwärts-Primer [50 ng/µl] |
| 1,0 µl | Rückwärts-Primer [50 ng/µl] |
| 200 ng | DNA-template |
| 1,0 µl | EHF Enzym-Mix [3,5U/µl] |
| ad 50 µl | $dH_2O$ |

Die PCR erfolgt in programmierbaren PCR-Maschinen in speziellen, dünnwandigen PCR-Gefäßen.

PCR-Programm:

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 94°C | 3 min. | Denaturierung |
| 40x | 94°C | 30 s | Denaturierung |
| | 55°C | 30 s | „Annealing“ |
| | 70°C | 2,5 min. | Elongation |
| | 70°C | 7 min. | Elongation |
| | 4°C | ∞ | Reaktionsende, Lagerung |

### 4.3.4 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgt unter Verwendung des ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer), einer PCR-Maschine und des ABI Prism™ 377 DNA-Sequencers.
Das Reaktionsprinzip entspricht der von Sanger und Coulson entwickelten PCR-Kettenabbruchmethode. Jedoch sind im Unterschied zur ursprünglichen Methode die vier Didesoxynukleotidklassen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Sequenzierreaktion kann so in einem Ansatz erfolgen, da der Sequencer nach elektrophoretischer Auftrennung der Probe und Anregung der Farbstoffe durch einen Laser die spezifischen Fluoreszenzstrahlungen durch eine Kamera digitalisiert. Die

unterschiedlichen Signale werden an einen Computer weitergeleitet und mit der mitgelieferten Software ausgewertet.

| Reaktionsansatz: | | |
|---|---|---|
| | 4 – 8 µl | Terminator-Mix |
| | 50 ng | Sequenzier-Primer |
| | 1 µg | DNA-Templat |
| | ad 20 µl | $dH_2O$ |

| Temperaturzyklen: | | | |
|---|---|---|---|
| | | 96°C | 2 min. |
| | 25x | 96°C | 10 s |
| | | 50°C | 5 s |
| | | 60°C | 4 min. |
| | | 4°C | Reaktionsende, Lagerung |

Nach Programmende wird die DNA der Probe mit Ethanol gefällt (4.2.5). Das Pellet wird in 4 µl Formamid/EDTA-Probenpuffer gelöst. Nach 3-minütiger Denaturierung bei 95°C werden 2 µl zur Beladung des Sequenziergels eingesetzt.

**Sequenziergel** (5% Polyacrylamid / 7M Harnstoff)

| Ansatz: | | |
|---|---|---|
| | 21 g | Harnstoff |
| | 8,4 ml | 30%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1) |
| | 6,0 ml | 10x TBE, pH 8,0 |
| | 20,0 ml | $dH_2O$ |

Die Lösung wird so lange gerührt, bis die Harnstoffkristalle vollständig gelöst sind, über eine Membran (Porengröße 0,2 µm) gefiltert und 5 Minuten entgast. Die Gelapparatur muss gründlich mit Alconox, $dH_2O$ und 90% Isopropanol gereinigt werden. Durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat (APS) zur Acrylamid-Lösung wird die Polymerisation gestartet.

| | |
|---|---|
| 350 µl | 10% (w/v) APS |
| 20 µl | TEMED |

Die Auftrennung der Proben erfolgt in TBE (pH 8,0) bei 48 W und dauert ca. 10 Stunden.

Neuerdings kann alternativ ein Kapillar-Sequencer ABI Prism® 3100 verwendet werden. Die einzelnen Proben werden hier in einer Gelmatrix in Kapillaren aufgetrennt.

### 4.3.5 Semi-quantitative real-time PCR

Die sogenannte „real-time“ PCR ist eine Weiterentwicklung der unter 4.3.3 beschriebenen Polymerase-Kettenreaktion. Die Zugabe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Sybr-Green©, der unter UV-Bestrahlung Licht bei etwa 500nm emittiert, lässt sich in PCR-Maschinen mit entsprechenden Photosensoren die Zunahme der DNA proportional zum emittierten Licht nach jeder Amplifikationsrunde quasi in Echtzeit mitverfolgen. Der Light Cycler der Firma Roche ist ein „real-time“ PCR-Gerät mit entsprechender Ausstattung und erlaubt aufgrund seiner Bauweise zudem extrem kurze Amplifikationszyklen. Zur Quantifizierung der Genomamplifikation wurden Primer für den Bereich der VA-RNA-Gene verwendet.

| PCR-Ansatz: | | |
|---|---|---|
| | 2,0 µl | 10x Advantaq-Puffer |
| | 0,4 µl | dNTP-Mix [je 20mM] |
| | 0,75 µl | VAI cDNA for [50 ng/µl] |
| | 0,75 µl | VAI cDNA rev [50 ng/µl] |
| | 6 µl | der genomischen DNA-Präparation (4.3.2) |
| | 0,4 µl | AdvanTaq Enzym [3,5U/µl] |
| | ad 20 µl | $dH_2O$ |

Die PCR erfolgt in speziell für den Light Cycler entwickelten Glaskapillaren.

| PCR-Programm: | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 96°C | 1 s | Denaturierung |
| | 40x | 96°C | 1 s | Denaturierung |
| | | 62°C | 5 s | „Annealing“ |
| | | 72°C | 10 s | Elongation |
| | | 89°C | 5 s | Messung |
| | | 4°C | ∞ | Reaktionsende, Lagerung |

Die Ergebnisse der DNA-Messungen lassen sich als sigmoidale Amplifikationskurve darstellen. Als Bezugspunkt zum Vergleich der Templatmengen verschiedener PCR-Reaktionen wird der Wendepunkt (CP) einer Amplifikationskurve verwendet.

### 4.3.6 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von RNA erfolgt unter Verwendung des Trizol-Reagenz nach dem Handbuch. Speziell für flüssige Proben kann Trizol-LS verwendet werden. Für die Fraktionen des Rohrzuckergradienten (4.3.13) wurde das im Handbuch beschriebene, modifizierte Präzipitationsprotokoll verwendet.

### 4.3.7 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA übersetzt. Die reverse Transkription der isolierten RNA erfolgt mit Hilfe des Superscript™ II RT-Kits.
Abweichend zum Handbuch wird folgender Ansatz verwendet:

RT-Ansatz:
- 5 µg RNA
- 1 µl RT-Primer
- ad 12 µl $dH_2O$
- Inkubation für 10 min. bei 70°C
- 4 µl $1^{st}$ strand buffer
- 2 µl 0,1M DTT
- 1 µl 10mM dNTP-Mix
- Inkubation für 2 min. bei 42°C
- 1 µl Superscript II
- Inkubation für 50 min. bei 42°C
- Inkubation für 15 min. bei 70°C

### 4.3.8 Semi-quantitative RT-PCR

Als RT-PCR beschreibt man die Amplifizierung der aus der Reversen Transkription (4.3.7) erhaltenen cDNA. Das Reaktionsprinzip unterscheidet sich nicht von dem der normalen PCR (4.3.3).
Die RT-PCR wird hier dazu verwendet, Rückschlüsse auf die Menge der vor der Reversen Transkription vorhandenen RNA zu ziehen. Dabei geht man davon aus, dass die vorhergehende Reverse Transkription der verschiedenen RNA-Proben in allen Fällen gleich effizient war.
Jeder Reaktionsansatz der RT-PCR wird auf mehrere PCR-Gefäße verteilt (je 20 µl). Die Aliquots werden in derselben PCR-Maschine inkubiert, aber nach einer unterschiedlichen Zahl von Zyklen auf Eis gestellt. Da sich die DNA in der PCR im Idealfall in jedem Zyklus in Abhängigkeit von der Zahl der Templatmoleküle vermehrt, lässt sich bei anschließender Betrachtung verschiedener Proben desselben Zyklus im Agarose-Gel (4.2.3) durch Vergleich der Bandenstärken eine Aussage über die ursprüngliche Templatmenge machen. Diese Art der Bestimmung von mRNA-Mengen ist semi-quantitativ, da sie nur eine relative Aussage zulässt.

| PCR-Ansatz: | | |
|---|---|---|
| | 10 µl | 10x Reaktionspuffer |
| | 2 µl | dNTP-Mix [je 20mM] |
| | 14 µl | Vorwärts-Primer [50 ng/µl] |
| | 14 µl | Rückwärts-Primer [50 ng/µl] |
| | 0,75 µl | EHF Enzym-Mix [3,5 U/µl] |
| | ad 98µl | $dH_2O$ |

mischen,
2 µl cDNA hinzufügen,
mischen,
auf bis zu 4 Gefäße (je 20µl) verteilen.

| PCR-Programm: | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 95°C | 3 min. | Denaturierung |
| | X Zyklen | 95°C | 30 s | Denaturierung |
| | | 55°C | 30 s | „Annealing“ |
| | | 70°C | 2,5 min. | Elongation |
| | | 4°C | ∞ | Reaktionsende, Lagerung |

### 4.3.9 Northern Blot

RNAs, die im Agarose-Gel (4.2.3) aufgetrennt wurden, können spezifisch durch DIG-markierte Sonden visualisiert werden (4.3.10). Dazu müssen sie zunächst aus dem Agarose-Gel auf eine Nylon-Membran transferiert werden, z. B. im PosiBlot-Gerät.

Aufbau:

**Oben**
Schwamm
2 Blatt Whatman-Papier
0,8 - 2%iges Agarose-Gel
Maske
Nylon-Membran
2 Blatt Whatman-Papier
Membran-Auflage
Auflage
**Unten**

Alle Komponenten des Blots müssen luftblasenfrei aufgebaut und ausreichend in Northern Transfer-Puffer (10x SSC / 10x SSPE) getränkt sein. Der Transfer erfolgt innerhalb von 60 min. in der Posiblot-Kammer bei einem Druck von 75mmHg.

### 4.3.10 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

RNA-Sonden mit eingebauten Digoxigenin-markierten UTPs werden mit dem „DIG-RNA labeling kit“ in einer in vitro-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase hergestellt. Als Templat dienten PCR-Amplifikate der VA-RNA-Gene, die am 5’-Ende des Gegenstrangs einen im Primer (Northern VAI/II rev) enthaltenen T7-Promotor besitzen.

### 4.3.11 Detektion von RNAs mittels DIG-markierter Sonden (nach Northern Blot)

Die VA-RNAs aus Adenovirus-infizierten Zellen können auf der Nylonmembran mit spezifischen Digoxigenin-markierten RNA Sonden (4.3.10) detektiert werden. Dazu werden die im PosiBlot transferierten Nukleinsäuren zunächst durch UV-Bestrahlung auf der Nylonmembran fixiert. Anschließend werden unspezifische Bindestellen auf der Membran zunächst mit Lachssperm-DNA abgesättigt und die Membran dann wie folgt behandelt:

| | | **Inkubationszeit** |
|---|---|---|
| **Prähybridisierung :** | 10 mg sonifizierte Lachssperm-DNA in Collins-Hybridisierungslösung bei 65°C | 3-6 h |
| **Hybridisierung:** | DIG-markierte RNA-Sonde bei 95°C denaturieren; Prähybridisierungslösung bis auf 3 ml abnehmen; 3 µl der RNA-Sonde zugeben | mind. 12 h |
| **Waschen:** | in Northern-Waschpuffer schwenken | 5 min. |
| | in Northern-Waschpuffer bei 65°C rotieren | 2 h |
| **Blocken:** | in Northern-Puffer 1 schwenken | 5 min. |
| | in 75 ml 1% Blocking Reagenz (in Puffer 1) schwenken | 1 h |
| **Detektion:** | $\alpha$-DIG-Antikörper [1:20.000] in 40 ml Blocking-Lsg. | 30 min. |
| | in Northern-Puffer 1 + 0,3% Tween 20 | 3x 10 min. |
| | in Northern-Puffer 3 äquilibrieren | 5 min. |
| | mit CDP-Star [1:200] in 1ml Puffer 3 inkubieren | 5 min. |

Die an den DIG-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase setzt das Substrat CDP-Star in einer enzymatischen Reaktion um, die zu einer Lichtreaktion führt. Das emittierte Licht kann mit einem Röntgenfilm (BIOMAX MR) detektiert werden.

### 4.3.12 Zellfraktionierung

Bei der Zellfraktionierung werden die Zellkerne vom Zytoplasma abgetrennt. Voraussetzung dafür ist ein schonender Aufschluss der Zellen, bei dem die Zytoplasmamembran zerstört wird, die robustere Kernmembran aber intakt bleibt. Die Kerne und Zelltrümmer werden durch zwei kurze Zentrifugationsschritte bei 3.000 U/min. und 14.000 U/min. pelletiert und so vom zytoplasmatischen Lysat abgetrennt. Der Aufschluss der Zellen kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. In jedem Fall werden die Zellen zunächst in hypotonischem Lysepuffer inkubiert. Die Zellen schwellen durch osmotisch bedingte Wasseraufnahme soweit an wie die Zytoplasmamembran dem steigenden Druck nachgibt. Wird die Integrität der Zytoplasmamembran nun durch die Zugabe von Detergenzien (z. B. 0,5 % NP-40) herabgesetzt, platzen die Zellen auf. Alternativ zur Anwendung von Detergenzien kann die Zytoplasmamembran auch mechanisch zerstört werden. Hierzu verwendet man einen „Dounce“-Homogenisierer, in dem die Zytoplasmamembran der aufgeschwemmten Zellen durch hohe Scherkräfte zerstört wird.

### 4.3.13 Polyribosomenanalyse

Die Polyribosomenanalyse untersucht die Assoziation von mRNAs mit Ribosomen. Dabei gibt die Zahl der mRNA-gebundenen Ribosomen Auskunft darüber, wie effizient eine mRNA translatiert wird.

Etwa $10^7$ Zellen werden für 10 min. mit 50µg/ml Cycloheximid behandelt, um die Ribosomen auf der mRNA zu arretieren, und anschließend fraktioniert (4.3.12). Durch Zugabe von 15mM EDTA können in einem Kontrollansatz die Ribosomen disintegriert werden. Die zytoplasmatischen Extrakte werden in einem 10-50 %igen Rohrzuckergradienten durch Ultrazentrifugation bei 36.000 U/min. in einem SW41-Rotor aufgetrennt. Die Gradienten werden in 20 Fraktionen (à 600µl) zerlegt und die Absorption einer jeden Fraktion bei 254nm wird ermittelt. Diese Messung dient der Detektion der freien Ribosomen (60S) bei ca. 20 % Rohrzucker. Danach werden die Fraktionen paarweise vereint und aus jeweils 150µl des Gemisches wird mit Trizol-LS die RNA isoliert (4.3.6). Die RNA wird im Agarose-Gel aufgetrennt (4.2.3) und sichtbar gemacht. Gleiche Volumina jeder RNA-Präparation werden revers transkribiert (4.3.7) und die Menge spezifischer mRNAs wird mittels semi-quantitativer RT-PCR (4.3.8) bestimmt.

## 4.4 Proteinbiochemische Methoden

### 4.4.1 Ernte von Zellen für anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Zellen werden mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst. Durch eine kurze Zentrifugation bei 2.000 U/min. werden die Zellen pelletiert und können nach Abnahme des Mediumüberstands bei -20°C gelagert werden. Die Zellen werden in 200µl RIPA-Puffer (ggf. mit 4M Urea) lysiert und anschließend mit 50 µl 6x Laemmli-Puffer versetzt. Vor Zugabe des Laemmli-Puffers besteht die Möglichkeit, die Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode zu bestimmen (4.4.7). Alternativ können die Zellen in hypotonischem Lysepuffer, ggf. zur Zellfraktionierung (4.3.12) aufgeschlossen werden.
Die Proben werden 3 min. bei 95°C gekocht, für eine halbe Stunde bei 4°C geschüttelt und anschließend für 15 min. bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, um die genomische DNA zu scheren und die Viskosität des Lysats zu reduzieren.

### 4.4.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die Gele bestehen aus einem 5 %igen Sammelgel und einem in den beschriebenen Fällen 10 %igen Trenngel.

| | | |
|---|---|---|
| Sammelgel: | 6,8 ml | $dH_2O$ |
| | 1,7 ml | 30% Acrylamid-Lösung |
| | 1,25 ml | 1M Tris-Puffer (pH 6,8) |
| | 100 µl | 10% SDS |
| | 100 µl | 10% Ammoniumpersulfat |
| | 20 µl | TEMED |

| | | |
|---|---|---|
| Trenngel: | 7,9 ml | $dH_2O$ |
| | 6,7 ml | 30% Acrylamid-Lösung |
| | 5,0 ml | 1,5M Tris-Puffer (pH 8,8) |
| | 250 µl | 10% SDS |
| | 125 µl | 10% Ammoniumpersulfat |
| | 12,5 µl | TEMED |

Je nach Taschengröße werden 20 µl (15er-Kamm) oder 60 µl (10er Kamm) der vorbereiteten Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in Protein-Laufpuffer bei 120V und maximaler Stromstärke.

### 4.4.3 Western-Blot

Proteine, die durch SDS-PAGE (4.4.2) aufgetrennt wurden, können spezifisch durch Immunfärbung visualisiert werden. Dazu müssen sie zunächst aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert werden.

Aufbau:

**Anoden-Seite**
Schwamm
2 Blatt Whatman-Papier
Nitrocellulose-Membran
Polyacrylamid-Gel
2 Blatt Whatman-Papier
Schwamm
**Kathoden-Seite**

Die Komponenten des Blots müssen ausreichend im Western-Puffer getränkt sein. Beim Aufbau muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Nitrocellulose entstehen und die Membran nicht trocken wird. Der Blot wird in einem Plastikhalter fixiert und in die Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 37V und maximaler Stromstärke.

### 4.4.4 Ponceau S-Färbung von Western Blots

Mit Ponceau S-Lösung (0,1% Ponceau S (w/v) in 1% Essigsäure) lassen sich Proteine unspezifisch sichtbar machen. Dazu wird die Nitrozellulosemembran nach dem Western Blot mit $dH_2O$ gewaschen und dann 1 min. in der Färbelösung geschwenkt. Danach wird die Membran so lange mit $dH_2O$ entfärbt, bis die Proteinbanden klar hervortreten. Der Blot kann jetzt in Folie geschlagen und mit Hilfe eines Kopierers oder Scanners dokumentiert werden. Die Ponceau S-Färbung wird anschließend durch Waschen in PBS/0,1% Tween rückgängig gemacht.

### 4.4.5 Immunfärbung von Proteinen (nach Western Blot)

Die Seite der Nitrocellulose-Membran, auf die die Proteine transferiert wurden, wird mit Bleistift markiert. Die Membran wird kurz in PBS/0,1% Tween gewaschen und von Gelresten befreit. Die Membran wird zunächst in Milch-Lösung (PBS/0,1% Tween/ 5% Magermilchpulver) inkubiert, um freie unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulose abzusättigen. Die Verdünnung der Antikörper erfolgt ebenfalls in Milch-Lösung.

| | | |
|---|---|---|
| Blocken in Milch-Lösung | | 30 min. |
| 1.Antikörper (Verdünnung je nach Antikörper, s.Tabelle) | | 2 Stunden |
| Waschen: | $PBS^{++}$/0,1% Tween | 3x kurz |
| | Milch-Lösung | 15 min. |
| | $PBS^{++}$/0,1% Tween | 3x kurz |
| | Milch-Lösung | 15 min. |
| | $PBS^{++}$/0,1% Tween | 3x kurz |
| 2. Antikörper (anti-IgG, speziesspezifisch, Peroxidase-gekoppelt) | | 1 Stunde |
| Waschen: | $PBS^{++}$/0,1% Tween | 3x kurz |
| | Milch-Lösung | 15 min. |
| | $PBS^{++}$/0,1% Tween | 3x kurz |
| | Milch-Lösung | 15 min. |
| | $PBS^{++}$/0,1% Tween | 3x kurz |
| | Milch-Lösung | 15 min. |
| | $PBS^{++}$/0,1% Tween | 4x kurz |

Zur Detektion der gebundenen Antikörper mischt man die beiden Komponenten des SuperSignal® West Dura Kits im Verhältnis 1:1, pipettiert das Gemisch sofort auf die Nitrocellulose-Membran und schweißt diese in eine Plasikfolie ein. Die an den 2. Antikörper gekoppelte Peroxidase setzt das Substrat in einer enzymatischen Reaktion um, was schließlich zu einer Lichtreaktion führt. Das emittierte Licht kann mit einem Röntgenfilm (BIOMAX MR) detektiert werden.

Alternativ können Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet werden. Die Lichtsignale dieser Antikörper lassen sich in einem speziellen Detektionsgerät (Odyssey Infrared Imaging System) visualisieren. Vorteil dieser Methode ist direkte Digitalisierung der Daten, die u. a. eine Quantifizierung der Ergebnisse zulässt.

### 4.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Diese Methode basiert auf der Bindung eines Farbstoffes vorwiegend an basische und aromatische Aminosäuregruppen, wobei eine Farbänderung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration erfolgt. Das Absorptionsmaximum des gebundenen Farbstoffes liegt bei einer Wellenlänge von 595 nm. Der Bio-Rad Protein Assay kann zum Abgleich der Proteinmengen in SDS-freien Lysaten verwendet werden.

Dazu wird das Farbstoff-Konzentrat zunächst 1:5 mit $dH_2O$ verdünnt. 5 µl des Zelllysats werden in eine 1,5ml-Plastikküvette pipettiert und mit 1 ml der gebrauchsfertigen

Farbstofflösung versetzt. Im Photometer wird die Absorption der Proben bei 595 nm bestimmt.

### 4.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Biuret-Reaktion

Grundlage dieser Methode ist die Reduktion von $Cu^{2+}$ zu $Cu^{+}$ durch Proteine in alkalischem Medium. Die $Cu^{+}$-Konzentration kann dann nach Chelatbildung mit Bicinchoninsäure kolorimetrisch bestimmt werden. Der Pierce BCA Protein Assay wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten in RIPA-Puffer verwendet.

Zur Herstellung der Arbeitslösung werden Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 gemischt. Dann werden 50µl Zelllysat in eine 1,5ml-Plastikküvette pipettiert und mit 1ml der gebrauchsfertigen Arbeitslösung versetzt. Die restlichen Schritte erfolgen wie im Handbuch beschrieben. Die Bestimmung der absoluten Proteinwerte erfolgt durch Vergleich mit einer parallel erstellten Eichgeraden auf der Basis unterschiedlich konzentrierter BSA-Lösungen.

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Herstellung isogenischer Adenovirusmutanten mit defektiver VA-RNA Expression.

Um den Einfluss der Virus-assoziierten (VA)-RNAs I und II auf die Adenovirusreplikation angemessen untersuchen zu können, war es notwendig, Adenovirusmutanten zu verwenden, die Defekte in der Expression jeweils einer oder beider VA-RNAs besitzen, sich sonst aber genetisch nicht unterscheiden. In den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden bereits in zwei unabhängigen Projekten VA-RNA-defiziente Adenoviren konstruiert. Hinsichtlich unserer Fragestellung weisen diese Konstrukte allerdings einige Unzulänglichkeiten auf. Die VA-RNA I-Mutante Ad dl331 (Schneider et al., 1984), die noch heute weit verbreitet verwendet wird, besitzt leider keine verwandten Konstrukte mit einer VA-RNA II- oder Doppeldeletion sowie kein isogenisches Parentalvirus. Trotz weiterer Differenzen, z. B. in der E3-Region, werden daher oft die ebenfalls weit verbreiteten Laborstämme Ad dl300 und Ad dl309 zu Kontrollzwecken verwendet (Bett et al., 1995). Die übrigen VA-RNA-defizienten Mutanten, Abkömmlinge von Ad dl703 (Bhat and Thimmappaya, 1984), sind allesamt Hybride aus den Adenovirustypen 2 und 5. Die Hybridisierung der Genome erfolgte unabhängig für jede Mutante mittels homologer Rekombination. Die Genome der einzelnen Virusmutanten können sich daher in Abhängigkeit von der Rekombinationsstelle unterscheiden. Da wir zeigen konnten, dass die Expression der Genprodukte in den beiden Serotypen Ad2 und Ad5 durchaus unterschiedlich reguliert sein kann (unveröffentlichte Daten), könnten alleine diese Unterschiede im Genom verschiedene Phänotypen hervorrufen. Desweiteren wurden die kodierenden Bereiche der VA-RNA Gene, entsprechend der damals zur Verfügung stehenden Methoden, relativ umständlich durch Insertion adenoviraler DNA aus der E4-Region zerstört. Die Verwendung solch harscher Klonierungsmethoden und die fehlende Möglichkeit der routinemäßigen Überprüfung der eingeführten genetischen Veränderungen durch DNA-Sequenzierung, können - ähnlich wie beim üblicherweise verwendeten Wildtyp-Stamm Ad dl309 - zu unerkannten Klonierungsartefakten geführt haben (Gingras et al., 1996).

Wir haben uns daher dafür entschieden, neue, isogenische Adenovirusmutanten herzustellen, die entweder nur noch eine oder gar keine VA-RNA mehr exprimieren.

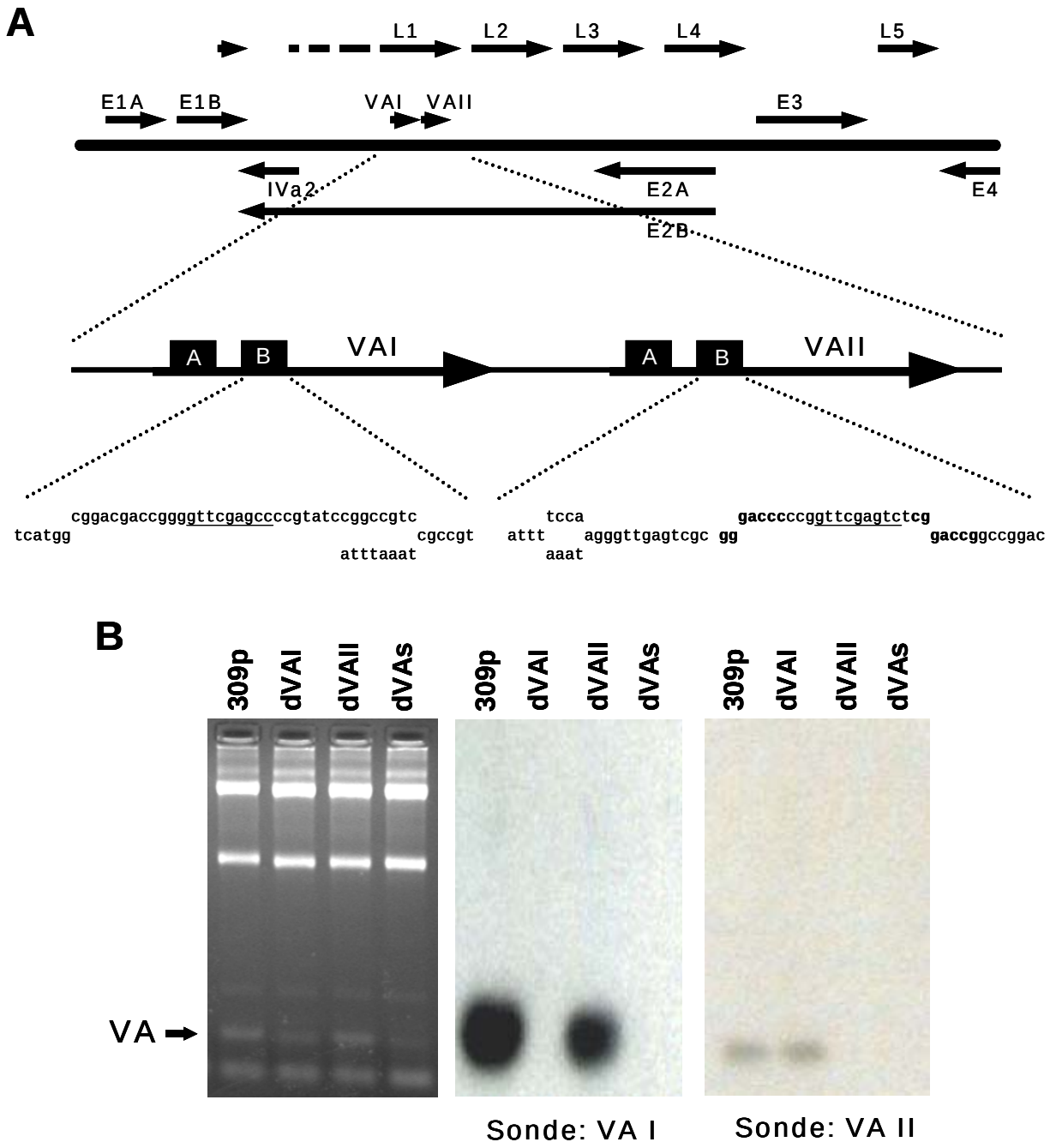



**Abb. 7. Adenovirusmutanten mit Deletionen der VA-RNA Gene.** (A) Schematische Darstellung des Adenovirusgenoms und der eingeführten Mutationen. Aufgeführt sind die frühen (E1-E4) und die späten (Iva2, L1-L5) Transkriptionseinheiten sowie die Gene für die virus-assoziierten (VA)-RNAs. Die Genstruktur der VA-RNA mit den intragenischen Promotorelementen, BoxA und BoxB, und die in BoxB eingeführten Veränderungen sind detailliert dargestellt. Die Expression jeweils einer oder beider VA-RNAs wird durch Deletionen im BoxB-Element (unterstrichen) unterbunden. Die Deletionen wurden entweder durch ortsgerichtete Mutagenese oder durch Exzision mit den Restriktionsenzymen *Ppu*MI und *Rsr*II (fett) und anschließende Re-Ligation erzeugt. Die deletierten Sequenzabschnitte sind nach oben verschoben, Insertionen nach unten. Aus klonierungstechnischen Gründen wurde jeweils eine *Swa*I-Schnittstelle in der Nähe der Deletionen eingeführt (Details in Abschnitt 3.2.14). (B) VA-RNA Expression der Virusmutanten. H1299-Zellen wurden mit den Virusmutanten 309p (wt), dVAI ($VAI^-/VAII^+$), dVAII ($VAI^+/VAII^-$) und dVAs ($VAI^-/VAII^-$) mit einer M. O. I. von 3 infiziert. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet. Die RNA wurde aus den Lysaten isoliert und mittels Gel-Elektrophorese und im Northern Blot mit spezifischen Sonden gegen VA-RNA I oder II analysiert.

Diese Mutanten wurden alle in einem Plasmid-gestützten System von Ad dl309 abgeleitet (weitere Details in Abschnitt 4.2.14).

Die VA-RNA-Expression wurde, wie schon bei Ad dl331, durch Deletion des intragenischen BoxB-Promotorelements unterbunden (Abb. 7A). Die Wirksamkeit der eingeführten Deletionen wurde nach Erhalt der replikationsfähigen Virusmutanten mittels Gelelektrophorese der RNA aus infizierten Zellen und durch Northern Blot-Analyse mit spezifischen Sonden gegen VA-RNA I und II überprüft (Abb. 7B). Wie beabsichtigt, exprimiert 309p beide, dVAI und dVAII jeweils nur noch eine und dVAs keine VA-RNA mehr. Die neuen Adenovirusmutanten wurden in den nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

**Tabelle 2. Herkunft und Ras-Status der verwendeten Zellen und Zelllinien.** Die Nomenklatur und die Angaben zum Ursprungsgewebe entsprechen den Angaben der Urheber und Vertreiber. Frühere Untersuchungen zum Ras-Status der Zelllinien sind aufgeführt. Der Ras-Status der mutierten Zelllinien wurde mittels PCR-Amplifikation und Sequenzierung der entsprechenden Genomabschnitte überprüft und entsprach - bis auf NCI-H2347 - in allen Fällen den bekannten Daten.

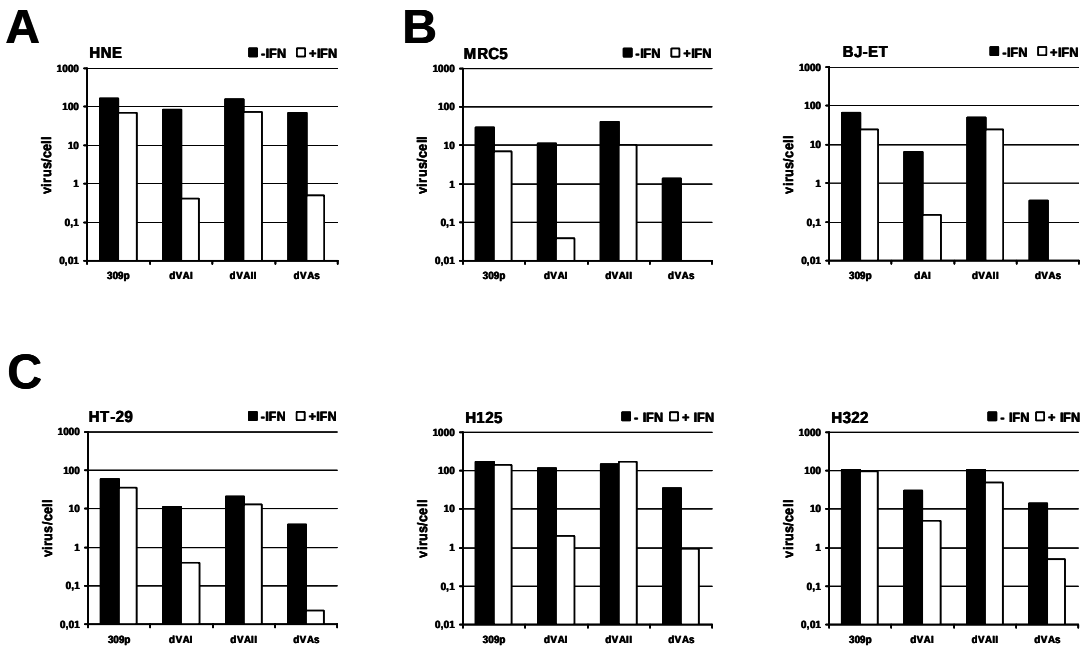
| Zell(linie) | Herkunft | Ras Status | | Referenz |
|---|---|---|---|---|
| HNE | Nasenepithel | | wt | PromoCell |
| MRC5 | Fötale Lungenfibroblasten | | wt | ATCC |
| BJ-ET | Vorhautfibroblasten | | wt | VII |
| HT-29 | Darm-Adenokarzinom | | wt | I |
| NCI-H125 | Lungen-Adenokarzinom | | wt | II |
| NCI-H322 | Lungen-Adenokarzinom | | wt | III |
| NCI-H1299 | Lungen-Adenokarzinom | N | Q61K | I |
| NCI-H1373 | Lungen-Adenokarzinom | K | G12C | III |
| NCI-H2347 | Lungen-Adenokarzinom | K | G12S | ATCC * |
| A549 | Lungen-Karzinom | K | G12S | V |
| HCT116 | Darm-Karzinom | K | G13D | I |
| HepG2 | Leber-Karzinom | N | Q61L | I |
| HT-1080 | Fibrosarkom | N | Q61K | I |
| PANC-1 | Pankreas-Karzinom | K | G12D | IV |
| Shep | Neuroblastom | N | Q61K | VI |

I Davies et al., 2002
II Hawk et al., 1996
III Mitsudomi et al., 1992; Mitsudomi et al., 1991
IV Sumi et al., 1994
V Valenzuela and Groffen, 1986
VI Taparowsky et al., 1983
VII Voorhoeve and Agami, 2003

* im Gegensatz zu N-Ras Q61R (ATCC) fanden wir die angegebene Mutation.

## 5.2 Ras-transformierte Zellen unterstützen die Replikation VA-RNA I-loser Adenoviren.

Nach der Herstellung der isogenischen VA-RNA-Mutanten waren wir nun in der Lage, den Einfluss der einzelnen VA-RNAs auf die Adenovirusreplikation in Abhängigkeit vom Ras-Status der Wirtszelle zu untersuchen. Dazu wurden 15 verschiedene Zellen und Zelllinien mit unterschiedlichem Ras-Status (Tabelle) mit den verschiedenen Viren infiziert und drei Tage später der Virusertrag bestimmt. In Anlehnung an frühere derartige Experimente (Kitajewski et al., 1986b), wurde die Replikation zusätzlich in Gegenwart von Interferon $\alpha$ untersucht, das die Expression des *pkr* Gens steigert und daher die antiviralen Effekte der PKR verstärkt. In primären, humanen Epithelzellen der Nasenschleimhaut (HNE) bewirkte die Unterbindung der VA-RNA I Expression einen leichten, etwa 3fachen Rückgang des Virusertrags im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 8A). Die gleichzeitige Unterbindung der VA-RNA II-Expression erbrachte keinen zusätzlichen Rückgang, passend zu der Beobachtung, dass die alleinige Deletion des VA-RNA II-Gens keinen Effekt auf den Virusertrag hatte. In Gegenwart von Interferon $\alpha$ hingegen wurde der Wachstumsdefekt der VA-RNA I-defizienten Virusmutanten dramatisch verstärkt. Während die Viruserträge von Wildtyp und dVAII-Mutante nur etwa 3fach reduziert waren, sanken die Erträge der VA-RNA I-losen Viren etwa 300fach.



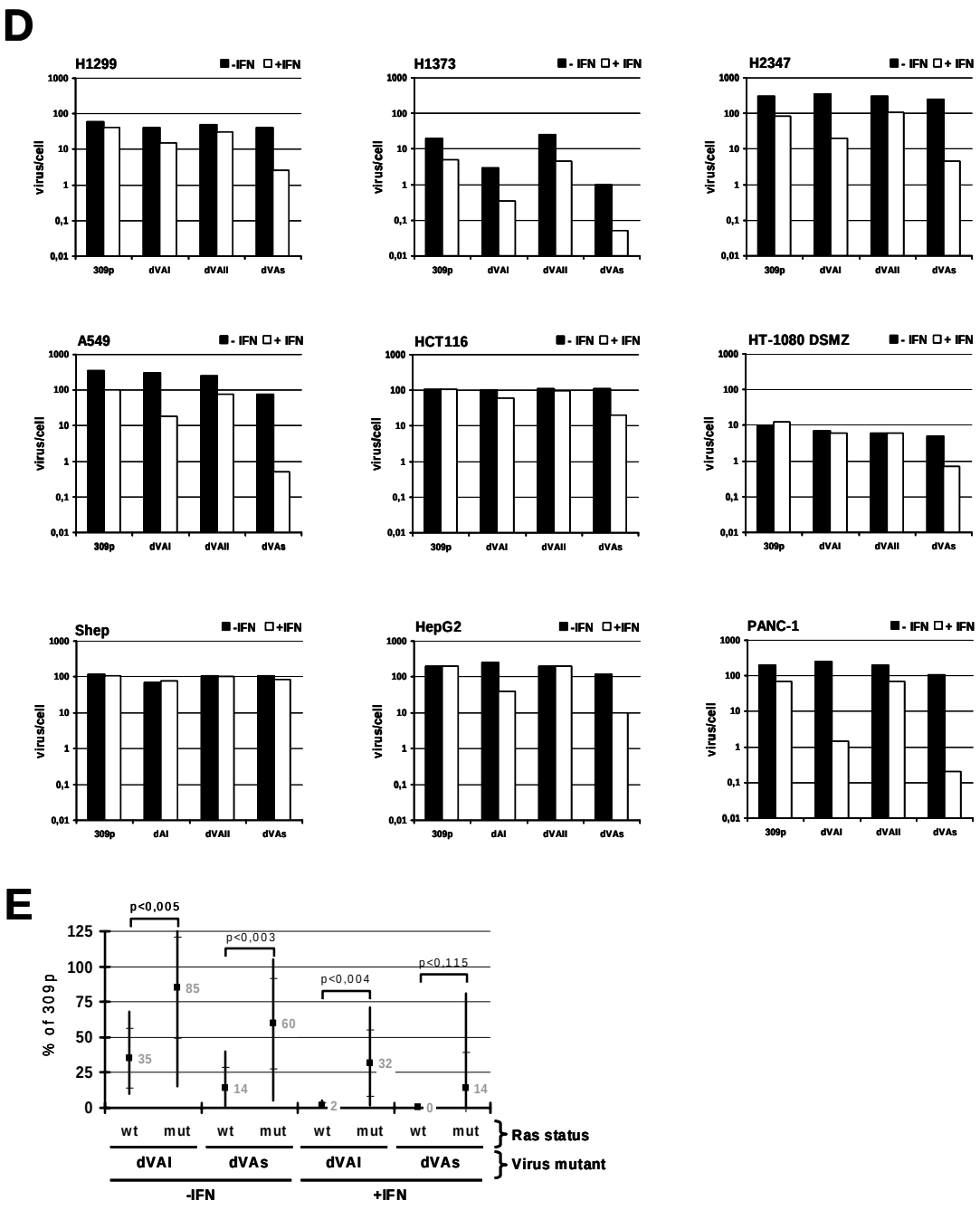



**Abb. 8. Die Permissivität von Tumorzellen für dVAI Replikation korreliert mit Ras-abhängiger Transformation.** (A-D) Replikation VA-loser Adenoviren in Zellen mit unterschiedlichem Ras-Status. Primäre humane Nasenepithelzellen (HNE, A), immortalisierte Fibroblasten MRC5 und BJ (B), Tumorzelllinien mit wild-typischem (C) und mutiertem Ras (D) wurden mit 309p, dVAI, dVAII und dVAs mit einer M. O. I. von 0,5 in Abwesenheit und in Gegenwart von Interferon α infiziert. 72 Stunden nach Infektion wurde der Virusertrag mittels Immunfluoreszenz-Titration auf NCI-H1299 Zellen bestimmt. (E) Gesteigerte Replikationsfähigkeit von VAI-losen Adenoviren in Zellen mit aktiviertem Ras. Der prozentuale Ertrag von dVAI und dVAs verglichen mit dem Ertrag von 309p beschreibt die Replikationsfähigkeit der Virusmutanten in den unterschiedlichen Zellen und Zelllinien. Die Grafik zeigt die durchschnittliche Replikationsfähigkeit (■) von dVAI und dVAs in Abhängigkeit vom Ras-Status der Wirtszelle. Die Vertikalen beschreiben den Bereich zwischen den Höchst- und Tiefstwerten, die Horizontalen die Standardabweichung von den Durchschnittswerten. Die Signifikanz für eine erhöhte Replikationsfähigkeit der VA-Mutanten in Gegenwart einer Ras-Mutation wurde mit Hilfe des Student's t-Tests ermittelt. Die Ablehnungswahrscheinlichkeit ist für jedes Paar von Stichproben angegeben.

Ein ähnliches Replikationsmuster ließ sich in allen immortalisierten (Abb. 8B) oder transformierten (Abb. 8C) Zellen mit wild-typischem Ras beobachten. In allen Fällen vermehrten sich die VA-RNA I-losen Viren in Abwesenheit von Interferon nur unwesentlich schlechter als der Wildtyp (außer in BJ-ET Zellen), ihr Ertrag sank aber mindestens 50 - 100fach in Gegenwart des Zytokins. Die Replikationsfähigkeit der Doppelmutante war in vielen Zelllinien sogar noch stärker reduziert (z. B. MRC5 oder HT-29). Im Gegensatz dazu unterstützten alle Zellen mit mutiertem Ras in Abwesenheit von Interferon vollständig die Adenovirusreplikation unabhängig vom VA-RNA-Status des Virus. Einzige Ausnahme bildeten NCI-H1373-Zellen, die trotz einer aktivierenden Mutation im Gen für K-Ras ein ähnliches Replikationsmuster der Virusmutanten zeigten wie Zellen mit wild-typischem Ras. In Gegenwart von Interferon war die Permissivität der Ras-mutierten Zellen für die Replikation VA-RNA I-loser Viren interessanterweise sehr uneinheitlich: vier der neun Zelllinien (NCI-H1299, HCT116, HT-1080 DMSZ und Shep) unterstützten die Replikation der VA-RNA I-Mutanten auch in Gegenwart von Interferon nahezu vollständig (lediglich die Replikation der Doppelmutante war in diesen Zellen, außer in Shep, etwa 10fach reduziert). In PANC-1 Zellen hingegen sank der Virusertrag der VA-RNA I-Mutanten in Gegenwart von Interferon fast so stark wie in primären Zellen, etwa 100fach. Die übrigen vier der neun Ras-mutierten Zelllinien zeigten hinsichtlich der dVA-Permissivität einen intermediären Phänotyp: die Ad dVAI-Erträge waren in Gegenwart von Interferon etwa 10fach reduziert, die Erträge der Doppelmutante noch etwas mehr, jedoch keineswegs so stark wie in den Zellen mit wildtypischem Ras.

Um diese Zusammenhänge quantitativ darzustellen und ihre statistische Relevanz zu ermitteln, wurde der durchschnittliche Virusertrag der VA-RNA I-losen Virusmutanten gegenüber dem Wildtyp und in Abhängigkeit vom Ras-Status der Wirtszelle ermittelt (weitere Details s. Abb. 8E). Der durchschnittliche Virusertrag der VA-RNA I-defizienten Viren war, mit Ausnahme der Doppelmutante in Gegenwart von Interferon, in den Ras-mutierten Zellen signifikant erhöht, bei einem Signifikanzniveau von über 98%. Der größte Ras-bedingte Replikationsvorteil einer VA-RNA-Mutante ergab sich für Ad dVAI in Gegenwart von Interferon. Das Virus erreicht dort durchschnittlich 32% des Wildtyp-Ertrags, während es in Zellen mit wildtypischem Ras im Durchschnitt nur 2% des Wildtyp-Niveaus erlangt.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass alle getesteten Zellen mit wildtypischem Ras eine geringe Permissivität für die Replikation von VA-RNA I-losen Viren besitzen, während eine Vielzahl der Ras-transformierten Zelllinien die Vermehrung dieser Viren, wenn auch teilweise eingeschränkt, so doch signifikant unterstützt. Allerdings konnten wir auch, am Beispiel der PANC-1 Zellen, demonstrieren, dass das bloße Vorhandensein einer Ras-Mutation keineswegs hinreichend für einen dVAI-permissiven Phänotyp ist. Aus diesem Grund versuchten wir nun, mehr über die molekularen Hintergründe der erhöhten dVAI-Permissivität Ras-mutierter Tumorzellen zu erfahren.

### 5.3 PKR bleibt trotz aktivierender Ras-Mutationen stimulierbar.

Um zunächst den direkten Einfluss von mutiertem Ras auf die PKR-Aktivität zu untersuchen, wählten wir zwei Zelllinien mit unterschiedlichem Ras-Status, die sich eindeutig in ihrer Permissivität für dVAI-Mutanten unterscheiden, NCI-H125 (Ras wt, nicht-permissiv) und NCI-H1299 (Ras mut, permissiv). Die beiden Zelllinien stammen aus derselben Tumorspezies (Adenokarzinom der Lunge) und weisen morphologisch, wie auch im Wachstumsverhalten starke Ähnlichkeiten auf. Wir haben zunächst die Aktivierung der PKR nach Infektion mit den verschiedenen Adenovirusmutanten untersucht. Dazu wurde die Phosphorylierung von eIF2$\alpha$ nach Infektion mit den verschiedenen Virusmutanten in Gegenwart und Abwesenheit von Interferon ermittelt (Abb. 9A). In H125-Zellen führte die Infektion mit VA-RNA I-losen Viren zu einem starken Anstieg der Phosphorylierung von eIF2$\alpha$, während die Viren mit intakter VA-RNA I-Expression in der Lage waren, diesen Anstieg zu verhindern. In H1299-Zellen hingegen war in Abwesenheit von Interferon nach Infektion mit den VA-RNA I-defizienten Viren kein Anstieg der eIF2$\alpha$-Phosphorylierung zu beobachten. Dies entspricht der Annahme, dass mutiertes Ras die Aktivierung der PKR verhindern kann (Mundschau and Faller, 1992). Unter Zugabe von Interferon führte die Infektion mit den VA-RNA I-losen Viren jedoch zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von eIF2$\alpha$, der im Ausmaß dem zu beobachtenden Anstieg in H125-Zellen entsprach. Um nun zu überprüfen, ob der Anstieg der eIF2$\alpha$-Phosphorylierung wirklich auf aktive PKR zurückzuführen ist, wurde synthetische, doppelsträngige RNA (polyIC) direkt mittels Transfektion in die Zellen eingebracht, um die endogene PKR zu aktivieren (Abb. 9B).

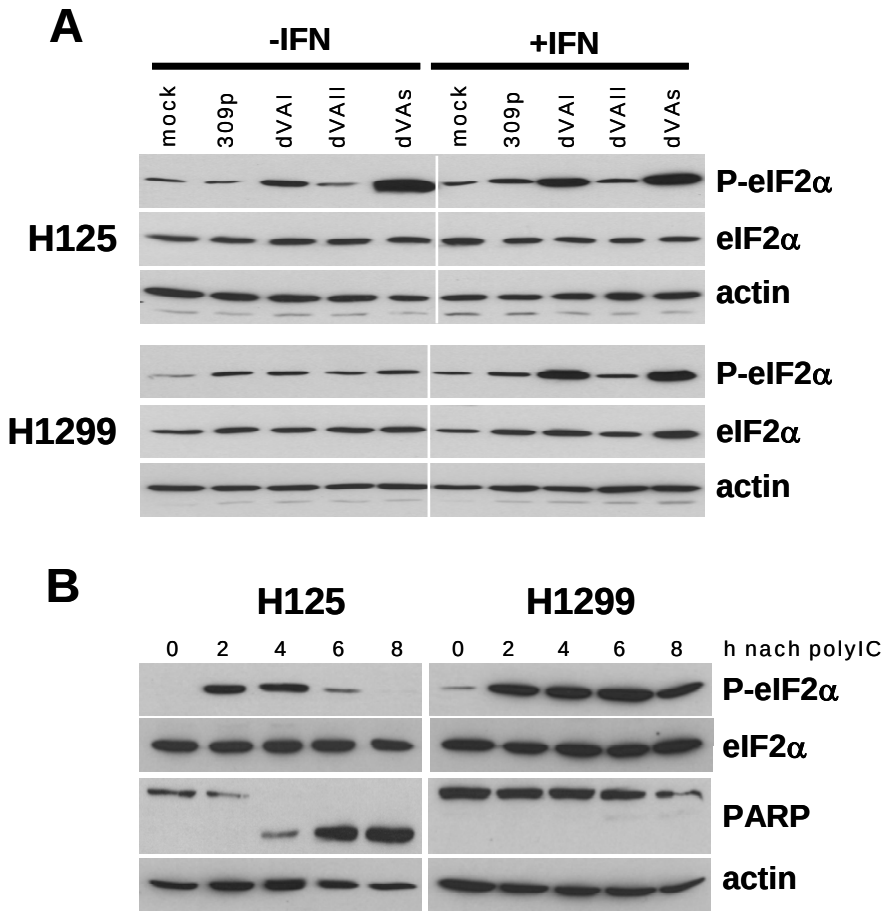



**Abb. 9. Die PKR bleibt auch in Ras-transformierten Zellen aktivierbar.** (A) eIF2α-Phosphorylierung nach Adenovirusinfektion. H125- und H1299-Zellen wurden mit 309p, dVAI, dVAII oder dVAs mit einer M. O. I. von 1 in Gegenwart oder Abwesenheit von Interferon α infiziert. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die angegebenen Proteine oder Phosphomodifikationen analysiert. (B) eIF2α Phosphorylierung nach polyIC-Transfektion. H125- und H1299-Zellen wurden mit polyIC transfiziert und 0, 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Transfektion geerntet. Die Lysate wurden wie oben analysiert.

Bereits nach zwei Stunden zeigte sich auch hier in beiden Zellen ein vergleichbar starker Anstieg der eIF2α-Phosphorylierung. Die Aktivierung der PKR durch polyIC-Transfektion stellt einen starken Apoptose-Stimulus dar (Gil and Esteban, 2000). Die Aktivierung zellulärer Caspasen während der Apoptose lässt sich anhand der Spaltung der Poly-ADP-Ribosyl-Polymerase, PARP, einem Substrat der Caspase-3, beobachten. Interessanterweise führte die PKR-Aktivierung nur in H125-Zellen zu einer raschen PARP-Spaltung, sprich Apoptoseinduktion, während in H1299-Zellen weder eine Spaltung von PARP, noch morphologische Anzeichen von Apoptose zu beobachten waren. Möglicherweise korreliert also die fehlende Fähigkeit zur PKR-

vermittelten Apoptoseinduktion mit der erhöhten Permissivität für eine produktive dVA-Infektion. In jedem Fall zeigen diese Versuche aber, dass die PKR auch in Gegenwart aktivierender Ras-Mutationen aktivierbar bleibt.

Um jedoch eine genaue Aussage über die Bedeutung von mutiertem Ras für die

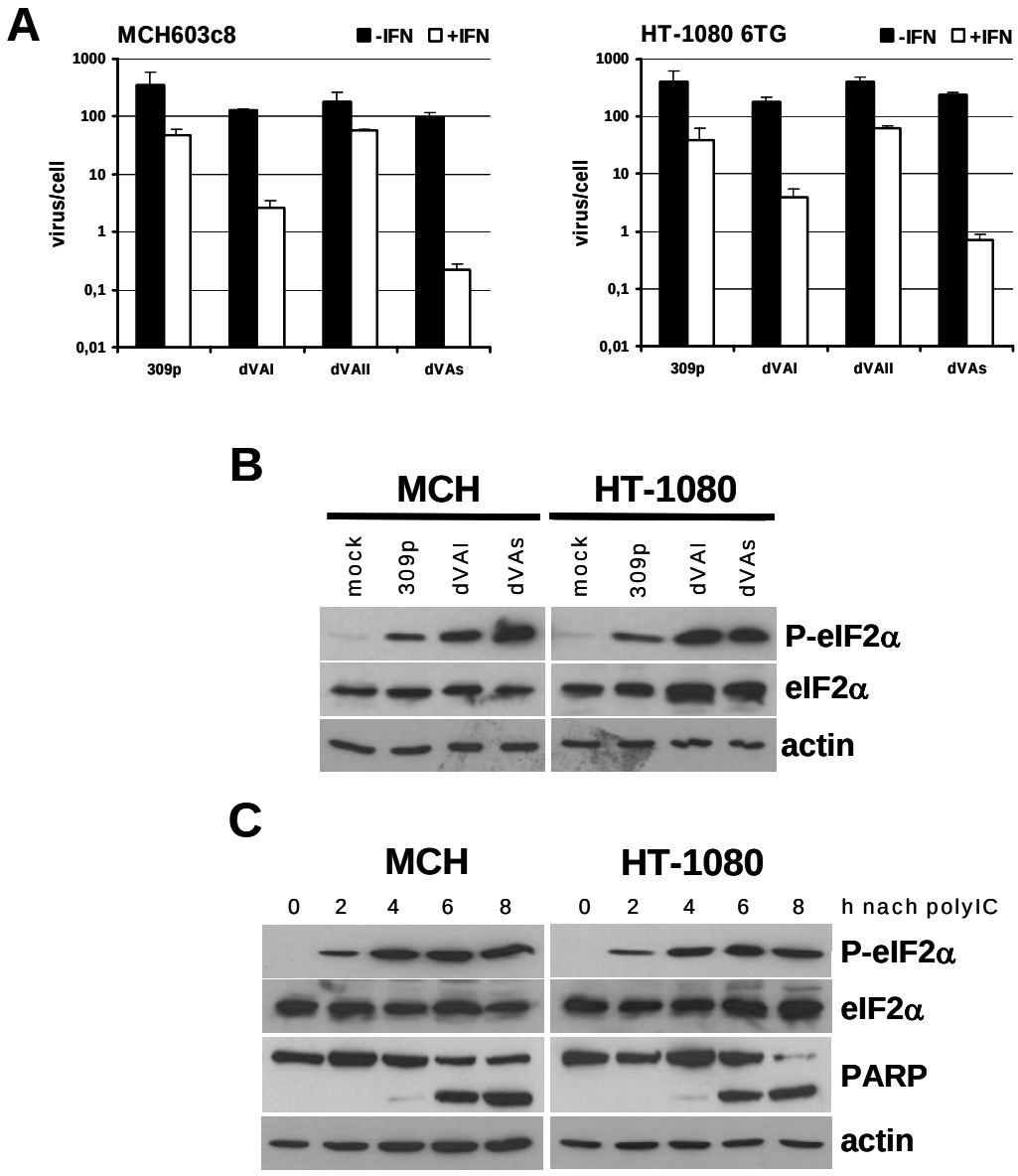



**Abb. 10. Die An- oder Abwesenheit einer aktivierenden Ras-Mutation hat keinen Einfluss auf dVA-Replikation und PKR-Aktivierung.** (A) Virusreplikation. Die isogenischen Zelllinien HT-1080 6TG (Ras mut) und MCH603c8 (Ras wt) wurden mit 309p, dVAI, dVAII oder dVAs mit einer M. O. I. von 0,5 in Abwesenheit oder Gegenwart von Interferon α infiziert. 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und der Virusertrag mittels Immunfluoreszenz-Titration in H1299-Zellen ermittelt. Die Abbildung zeigt die Durchschittswerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. (B, C) eIF2α-Phosphorylierung nach Adenovirusinfektion oder polyIC-Transfektion. HT-1080 6TG- oder MCH603c8-Zellen wurden mit 309p, dVAI oder dVAs mit einer M. O. I. von 1 infiziert (B) oder mit polyIC transfiziert (C). Nicht-infizierte Kontrollzellen sind mit „mock" gekennzeichnet. 0, 2, 4, 6, und 8 Stunden nach Transfektion oder 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate im Western Blot analysiert.

PKR-Aktivierung treffen zu können, ist es erforderlich, ein Paar von Zellen zu untersuchen, das sich ausschließlich durch eine solche aktivierende Ras-Mutation unterscheidet. Ein solches Paar von Zellen wurde vor einigen Jahren im Labor von Herrn Prof. Dr. Eric Stanbridge an der University of California entwickelt (Plattner et al., 1996) und uns freundlicherweise für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um ein Paar isogenischer Zellen, das sich von der Zelllinie HT-1080 6TG ableitet. (Diese Zelllinie ist ein Abkömmling der in Tabelle aufgeführten HT-1080 DSMZ-Zellen, unterscheidet sich allerdings morphologisch wie auch durch eine Deletion des Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-Gens). HT-1080 Zellen besitzen ein mutiertes N-Ras-Allel, das zu einem Aminosäureaustausch von Glutamin nach Lysin an Position 61 und somit zur konstitutiven Aktivierung von N-Ras führt. Dieses Allel wurde in MCH603c8-Zellen durch einen Mikrozellen-vermittelten Chromosomentransfer nachträglich durch ein wildtypisches ersetzt (Plattner et al., 1996). Nachdem wir diese Veränderung durch Sequenzierung des N-ras-Locus überprüft hatten, konnten wir nun in diesen Zellen den direkten Einfluss der Ras-Mutation auf die Replikation von VA-RNA-losen Adenoviren und die Aktivierbarkeit der PKR testen. Die MCH603c8-Zellen ließen in Gegenwart von Interferon, wie alle bisher getesteten Zellen mit wildtypischem Ras, kaum eine Replikation der VA-RNA I-defizienten Viren zu (Abb. 10A). Erstaunlicherweise zeigten aber die Parentalzellen exakt den gleichen Phänotyp: das Vorhandensein der Ras-Mutation reichte nicht aus, den Ertrag der VA-RNA I-losen Viren zu steigern. Gleichermaßen ließ sich in beiden Zelllinien die PKR sowohl durch Infektion mit VA-RNA I-losen Viren (Abb. 10B), wie auch durch polyIC-Transfektion aktivieren (Abb. 10C) und war in beiden Zelllinien in der Lage, Apoptose auszulösen. Dabei unterschieden sich die Zelllinien phänotypisch weder im Ausmaß noch in der Kinetik der untersuchten Effekte. Es bleibt also festzuhalten, dass das bloße Vorhandensein einer Ras-Mutation offensichtlich nicht ausreicht, der Aktivierung der PKR effizient entgegenzuwirken und somit die Replikation VA-RNA I-loser Adenoviren zu ermöglichen. Desweiteren scheint die Fähigkeit der PKR, Apoptose auszulösen, mit ihrer antiviralen Wirksamkeit zu korrelieren.

## 5.4 Die Inhibierung Ras-abhängiger Signalwege hemmt die Virusreplikation, hat aber keinerlei Einfluss auf die PKR-Aktivität.

Nachdem wir also eine direkte Wirkung von mutiertem Ras auf die PKR-Aktivität ausschließen konnten, blieb dennoch die Möglichkeit, dass eine gesteigerte Ras-Aktivität unterstützend auf das Viruswachstum wirken könnte. Dies schien vor allem

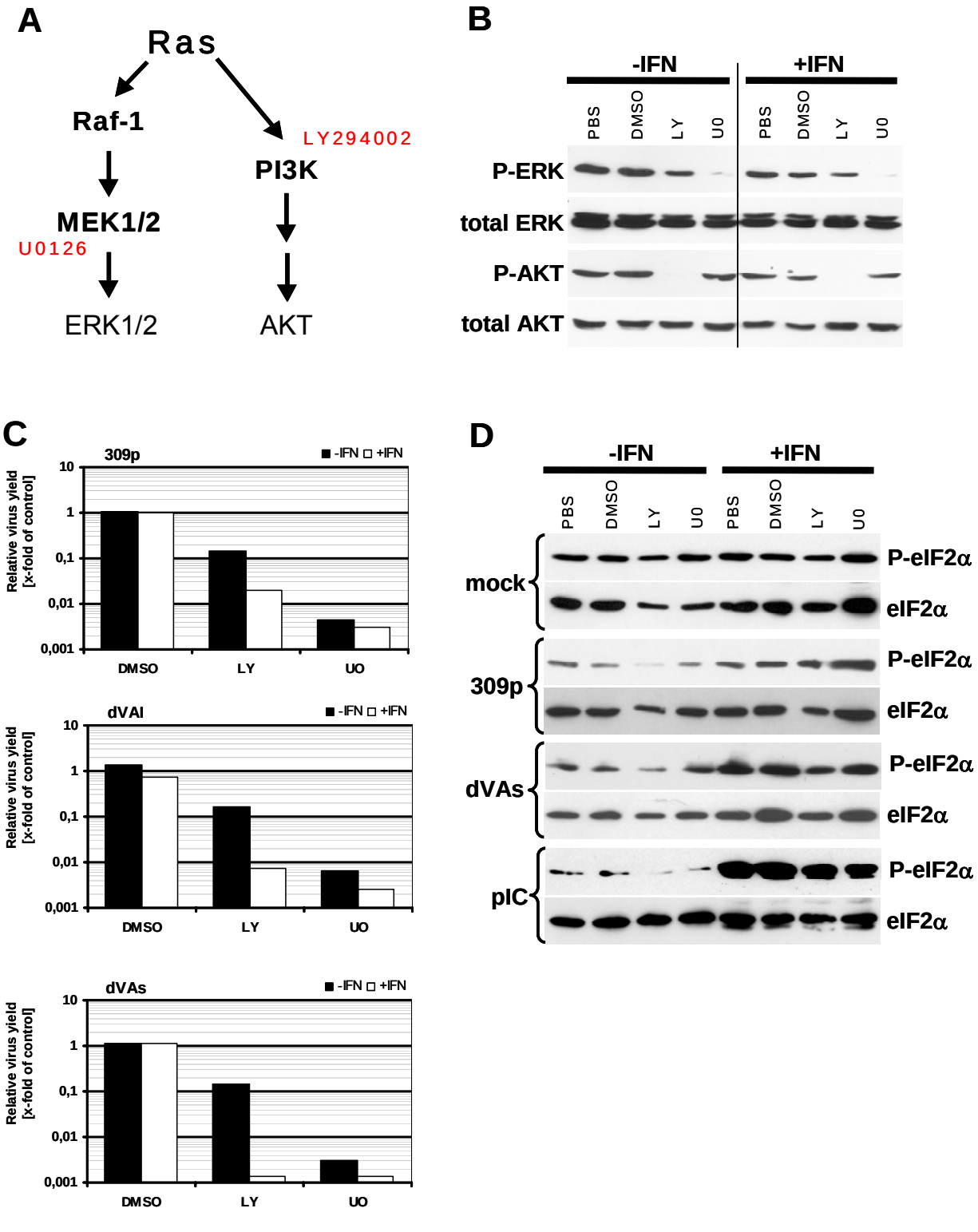


**Abb. 11. Spezifische Inhibitoren der Ras-Signalwege beeinträchtigen die Adenovirusreplikation, aber nicht die PKR-Aktivität.** (A) Ras-abhängige Signalwege und ihre Inhibitoren. Die Abbildung zeigt die wichtigsten durch aktives Ras stimulierten Signalkaskaden, Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT, nebst den jeweiligen Inhibitoren. (B) Wirksamkeit und Spezifität der Signalinhibitoren in Adenovirus-infizierten Zellen. H1299-Zellen wurden mit 309p mit einer M. O. I. von 3 in Abwesenheit und Gegenwart von Interferon $\alpha$ infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurde das Kulturmedium mit den Substanzen LY294002 [50µM], U0126 [10µM], dem Lösungsmittel DMSO oder PBS [je 0,1% v/v] versetzt. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die angegebenen Proteine oder deren Phosphomodifikationen analysiert. (C) Reduktion der Adenovirus-Replikation durch Inhibierung der Ras-Signalwege. H1299-Zellen wurden mit 309p, dVAI oder dVAs mit einer M. .O. I. von 0,5 in Abwesenheit oder Gegenwart von Interferon $\alpha$ infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurden dem Zellkulturmedium, wie unter B, die Inhibitoren und entsprechende Kontrollsubstanzen zugesetzt. 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und der Virusertrag durch Immunfluoreszenz-Titration ermittelt. Die Abbildung zeigt den relativen Virusertrag aus DMSO-, LY- und U0- im Vergleich zu PBS-behandelten Zellen. (D) Einfluss der Signalinhibitoren auf die Phosphorylierung von eIF2$\alpha$. H1299-Zellen wurden mit 309p oder dVAs mit einer M. O. I. von 3 in Abwesenheit oder Gegenwart von Interferon $\alpha$ infiziert oder mit polyIC transfiziert. Nicht-infizierte Kontrollzellen sind mit „mock“ gekennzeichnet. 3 Stunden nach Infektion bzw. Transfektion, wurden dem Zellkulturmedium, wie unter B, die Inhibitoren und entsprechende Kontrollsubstanzen zugesetzt. 8 Stunden nach Transfektion bzw. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate mittels Western Blot analysiert.

deshalb plausibel, da schon mehrere Gruppen unabhängig voneinander gezeigt hatten, dass sich die Replikation verschiedener PKR-sensitiver Viren durch die transiente Überexpression von aktivem Ras steigern ließ (Balachandran et al., 2001; Bergmann et al., 2001; Cascallo et al., 2003; Strong et al., 1998). Anstatt aber aktives Ras in unnatürlich hoher Menge in der Zelle zu exprimieren, beschlossen wir, endogene Ras-Signalwege mittels spezifischer, pharmakologischer Inhibitoren gezielt zu blockieren.

Dazu wurden infizierte Zellen mit den PI3K- bzw. MEK-Inhibitoren LY294002 und U0126 behandelt. Um den Einfluss der Ras-Signalwege auf die PKR-Aktivität untersuchen zu können, mussten wir allerdings berücksichtigen, dass vor allem ERK-abhängige Signalwege beim Viruseintritt in die Wirtszelle sowie beim Entpacken und dem Transport der viralen DNA zum Zellkern eine große Rolle spielen (Greber, 2002). Um diese Prozesse unbeeinflusst ablaufen zu lassen, wurden die Inhibitoren erst etwa 3 Stunden nach Infektion dem Medium zugesetzt. Sowohl der Raf-MEK-ERK- wie auch der PI3K-AKT-Signalweg (Details in Abb. 11A), ließen sich effizient und spezifisch auch in Adenovirus-infizierten Zellen durch die Substanzen LY und U0 inhibieren (Abb. 11B). Zunächst wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die Virusreplikation untersucht. Dazu wurden H1299-Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten in An- und Abwesenheit von Interferon infiziert und anschließend mit den Inhibitoren behandelt (Abb. 11C). Beide Inhibitoren waren in der Lage, den

Virusertrag merklich zu reduzieren. Während U0 die Virusausbeute in An- oder Abwesenheit von Interferon und unabhängig vom VA-RNA-Status der Viren etwa 300fach reduzierte, zeigte LY einen differenzierten Effekt. In Abwesenheit von Interferon reduzierte LY die Erträge aller Virusmutanten einheitlich etwa 10fach. Gleichzeitige Interferonbehandlung hingegen reduzierte die Viruserträge weiter und zwar in Abhängigkeit vom VA-RNA-Status der Viren: die Replikation des Wildtyp-Virus war etwa 50fach herabgesetzt, die von Ad dVAI etwa 100fach und die der Doppelmutante sogar 500fach. Daraus schließen wir, dass PI3K in der Lage ist, die negativen Auswirkungen, die Interferon und die fehlende VA-RNA-Expression auf die Virusreplikation haben, zumindest teilweise zu kompensieren. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass PI3K/AKT- und nicht Raf/MEK/ERK-Signalwege die PKR-Aktivität antagonisieren. Um dieser Vermutung weiter nachzugehen, haben wir den Einfluss der Inhibitoren auf die PKR-Aktivität unter verschiedenen PKR-aktivierenden Bedingungen untersucht. Dazu wurden H1299-Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von Interferon mit 309p oder dVAs infiziert oder mit polyIC transfiziert und anschließend mit den Inhibitoren behandelt (Abb. 11D). Überraschenderweise blieb die Phosphorylierung von eIF2$\alpha$ unter allen Umständen unverändert. Ein inhibitorischer Effekt der Ras-abhängigen Signalwege, also auch von PI3K/AKT, auf die PKR kann somit ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz bleibt festzuhalten, dass beide Ras-abhängigen Signalwege offensichtlich die Adenovirusreplikation begünstigen. Während der PI3K/AKT-Signalweg in der Lage ist, antivirale Effekte von Interferon und den Verlust der VA-RNA-Expression teilweise - und PKR-unabhängig - zu kompensieren, scheint ein intakter Raf/MEK/ERK-Signalweg essentiell für eine effiziente Virusreplikation zu sein.

## 5.5 Wechselseitige Verstärkung der Ras-abhängigen Signalwege und der Adenovirusreplikation.

Nachdem wir also festgestellt hatten, dass die Adenovirusreplikation maßgeblich von den Ras-abhängigen Signalwegen beeinflusst wird, wollten wir nun untersuchen, wie sich diese Signalwege während einer produktiven Adenovirusinfektion verhalten. Dazu wurden H1299-Zellen mit 309p infiziert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion die Phosphorylierung von ERK und AKT ermittelt (Abb. 12A). Wie bereits beschrieben (Greber, 2002), löst der Eintritt des Virus in die

Zelle bereits in den ersten Stunden nach Infektion einen Anstieg der Phosphorylierung sowohl von ERK wie auch von AKT aus. Nach diesem initialen Anstieg der Phosphorylierung konnten wir jedoch etwa 12-24 Stunden nach Infektion, einen zweiten, weitaus stärkeren Anstieg beobachten. Unsere Beobachtung wurde für AKT erst kürzlich in einer Publikation bestätigt (O'Shea et al., 2005a). Ihrzufolge ist der Anstieg der AKT-Phosphorylierung auf die Aktivität der frühen viralen Proteine E4orf1 und E4orf4 zurückzuführen.

Um zu erfahren, ob der Anstieg der ERK-Phosphorylierung durch Proteine der frühen oder späten Replikationsphase ausgelöst wird, wurde das Experiment zusätzlich in Gegenwart von Cytosin-arabinosid (AraC) durchgeführt. AraC blockiert zelluläre und virale DNA-Polymerasen und verhindert dadurch das Einsetzen der späten Phase der Virusreplikation. Die Wirksamkeit von AraC konnte durch die Analyse der Expression der viralen E1A- und Fiber-Proteine bestätigt werden: die Behandlung mit AraC verhinderte die Expression des späten Virusproteins, während E1A gleichzeitig akkumulierte. Dieses Verhalten entspricht dem bereits beschriebenen Phänotyp von Virusmutanten mit einem Defekt in der Induktion der späten Replikationsphase (Fessler and Young, 1998). Während die Behandlung mit AraC, wie zu erwarten war, keinerlei Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT hatte, war sie eindeutig in der Lage, den späten Anstieg der ERK-Phosphorylierung zu unterbinden. Dies zeigt, dass im Gegensatz zur AKT-Phosphorylierung der korrekte Eintritt in die späte Phase der Replikation Voraussetzung für den zweiten Anstieg der ERK-Phosphorylierung ist. Leider lässt diese Beobachtung aber keine Eingrenzung der potentiell hierfür verantwortlichen Virusproteine zu, da in der späten Replikationsphase neben den sogenannten „späten“ Proteinen auch die „frühen“ Proteine weiterhin exprimiert werden (Fessler and Young, 1998).

Um den Einfluss der Ras-Signalwege auf die Virusreplikation nochmals genau zu betrachten, wurden H1299-Zellen mit 309p infiziert und anschließend mit den Signalinhibitoren LY und U0 behandelt. Diesmal wurde der Virusertrag zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt (Abb. 12B). Die hemmende Wirkung der Inhibitoren auf die Virusreplikation ließ sich eindeutig reproduzieren: LY reduziert den Virusertrag etwa 10fach, U0 mehr als 300fach. Die Synthese der Nachkommenviren scheint bereits 48 Stunden nach Infektion abgeschlossen zu sein. Da unter U0-Behandlung aber bis 72 Stunden nach Infektion noch kein Anstieg des Virusertrags erkennbar ist, können wir zudem eine Verzögerung der Virusreplikation

durch U0 ausschließen und nehmen an, dass die Virusreplikation durch U0 vollständig verhindert wird.

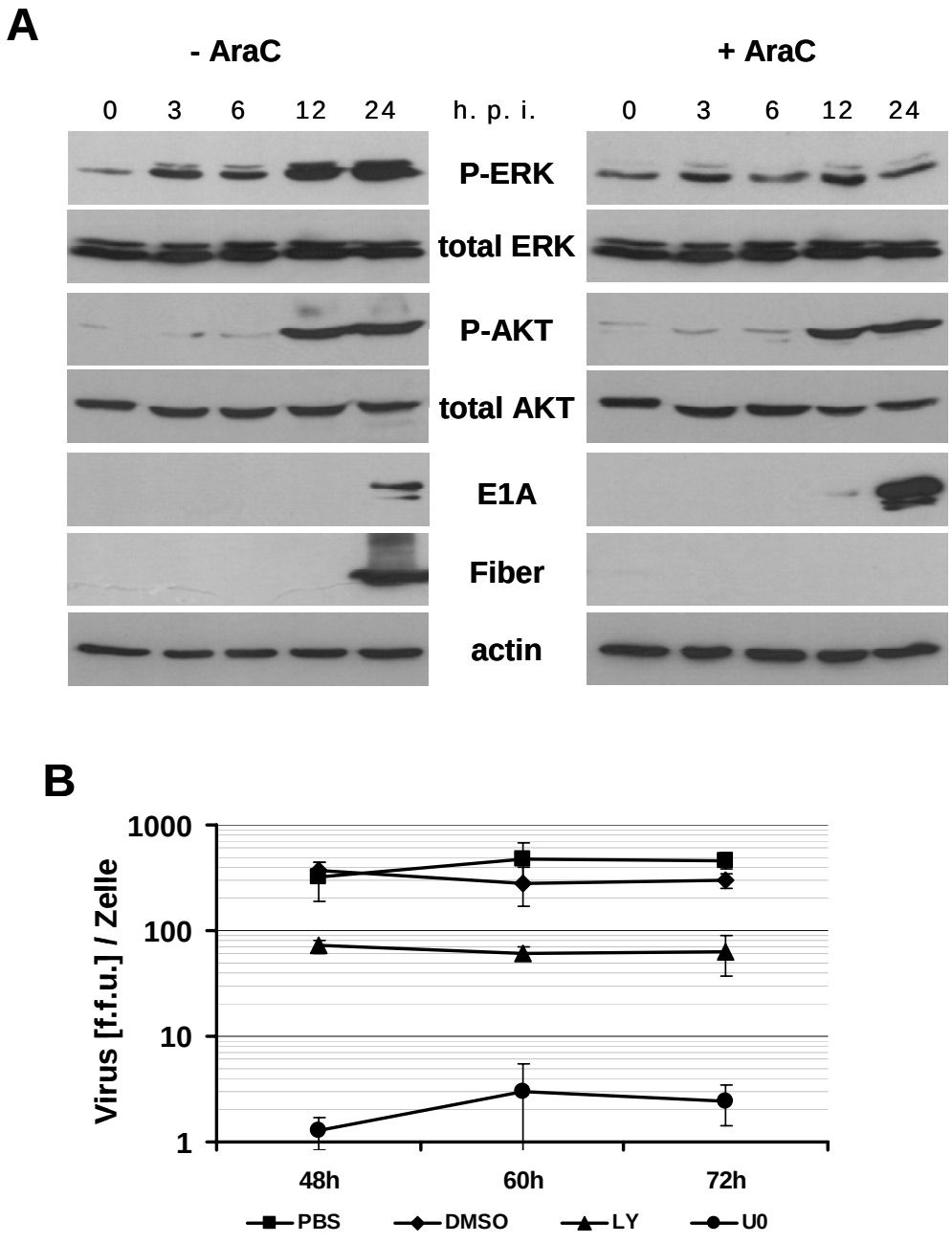



**Abb. 12. Wechselseitige Verstärkung von Ras-Signalkaskaden und Adenovirus-Replikation.** (A) Einfluss einer Adenovirusinfektion auf Ras-abhängige Signalwege. H1299-Zellen wurden mit 309p mit einer M. O. I. von 3 infiziert. 30 Minuten nach Infektion wurde die Hälfte der Proben mit AraC [20µg/ml] behandelt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Lysate mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die angegebenen viralen und zellulären Proteine oder Phosphomodifikationen analysiert. (B) Einfluss Ras-abhängiger Signalwege auf die Adenovirusreplikation. H1299-Zellen wurden mit 309p mit einer M. O. I. von 0,5 infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurde das Zellkulturmedium mit den Signalinhibitoren LY294002 [50µM] und U0126 [10µM], dem Lösungsmittel DMSO oder PBS [je 0,1% v/v] versetzt und danach alle 24 Stunden erneuert. 48, 60 und 72 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und der Virusertrag durch Immunfluoreszenz-Titration ermittelt. Die Abbildung zeigt die Durchschnittswerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

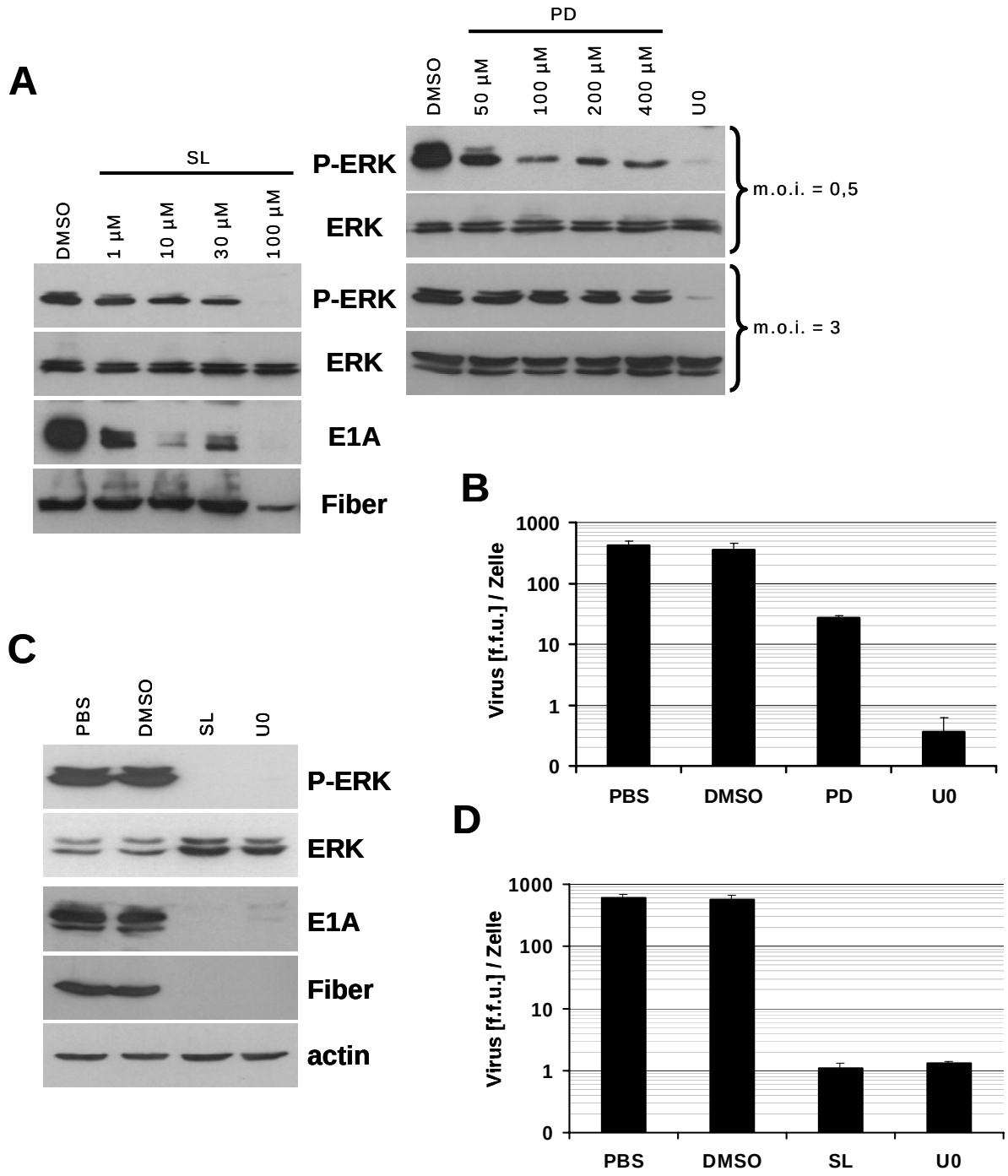



**Abb. 13. Die Inhibierung des Raf/MEK/Erk-Signalwegs hemmt die Adenovirusreplikation.** (A) Wirksamkeit der MEK-Inhibitoren SL327 und PD098059 in adenovirusinfizierten Zellen. H1299-Zellen wurden mit 309p mit einer M. O. I. von 0,5 und 3 infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit den Signalinhibitoren SL327 und PD098059 in den angegebenen Konzentrationen, mit U0126 [10µM] oder DMSO [0,1% v/v] behandelt. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate im Western Blot analysiert. (B) Einfluss von PD098059 auf die Virusreplikation. H1299-Zellen wurden mit 309p mit einer M. O. I. von 0,5 infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurden die Signalinhibitoren PD und U0 zugesetzt und alle 24 Stunden erneuert. 72 Stunden nach Infektion wurde der Virusertrag durch Immunfluoreszenz-Titration ermittelt. Die Abbildung zeigt die Durchschnittswerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. (C, D) Direkter Vergleich des Einflusses der wirksamsten MEK-Inhibitoren, SL327 und U0126, auf ERK-Phosphorylierung, virale Proteinmengen und Virusreplikation. Zellen wurden wie unter A behandelt. SL327 und U0126 wurden mit einer Konzentration von 100µM bzw. 10µM eingesetzt. Zelllysate wurden wie unter A analysiert, der Virusertrag wie unter B bestimmt.

## 5.6 Die Adenovirusreplikation lässt sich durch verschiedene MEK-Inhibitoren hemmen.

Um sicher zu gehen, dass die replikationshemmende Wirkung von U0 wirklich auf die Inhibition von MEK zurückzuführen ist und nicht aus unspezifischen Nebenwirkungen resultiert, haben wir den Einfluss weiterer pharmakologischer MEK-Inhibitoren auf die Adenovirusreplikation untersucht. Dazu wurde zunächst die Wirksamkeit der MEK-Inhibitoren SL327 (SL) und PD098059 (PD) in adenovirusinfizierten Zellen bestimmt. Bei der Infektion mit einer M. O. I. von 3 war SL, zumindest bei der höchsten getesteten Konzentration von 100µM, in der Lage, die ERK-Phosphorylierung effektiv zu unterbinden (Abb. 13A). Interessanterweise sanken die E1A-Mengen ebenfalls konzentrationsabhängig und proportional zur ERK-Phosphorylierung. Im direkten Vergleich zu U0 zeigte SL ebenfalls eine ausgeprägte Inhibierung der Virusreplikation, die sich nicht nur im reduzierten Virusertrag (Abb. 13D), sondern auch in verminderten Virusproteinmengen widerspiegelte (Abb. 13C). Die Behandlung mit PD zeigte hingegen selbst bei hoher Konzentration zunächst keine Wirkung (Abb. 13A). Erst bei einer reduzierten M. O. I. von 0,5 konnte PD die ERK-Phosphorylierung beeinträchtigen, wenn auch nicht gänzlich verhindern. Gleichermaßen zeigte PD im Vergleich zu U0 auch auf die Virusreplikation nur eine eingeschränkte inhibitorische Wirkung (Abb. 13B). Diese Beobachtung lässt sich aber durch eine Publikation von (Favata et al., 1998) erklären, die eine etwa 100fach reduzierte Affinität von PD zu MEK im Vergleich zu U0 beschreiben. Die Tatsache, dass neben U0 zwei weitere strukturell unverwandte MEK-Inhibitoren in Abhängigkeit von ihrer Wirkung auf die ERK-Phosphorylierung auch die Adenovirusreplikation beeinträchtigen, legt den Schluss nahe, dass die Adenovirusreplikation in der Tat direkt von der ERK-Aktivität abhängt.

## 5.7 Aktives ERK unterstützt die Akkumulierung viraler Proteine in der späten Phase der Replikation.

Im Folgenden galt es herauszufinden, welche Prozesse der Adenovirusreplikation nun tatsächlich von den Ras-Signalwegen beeinflusst werden. Dazu wurden H1299-Zellen mit 309p infiziert und anschließend mit LY und U0 behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde dann die Menge der viralen

Proteine, der Gehalt an viraler, genomischer DNA und die virale mRNA-Synthese gemessen. 10 Stunden nach Infektion verursachte die Blockierung des PI3K/AKT-Signalwegs einen deutlichen Rückgang der viralen Proteinmenge, während U0-

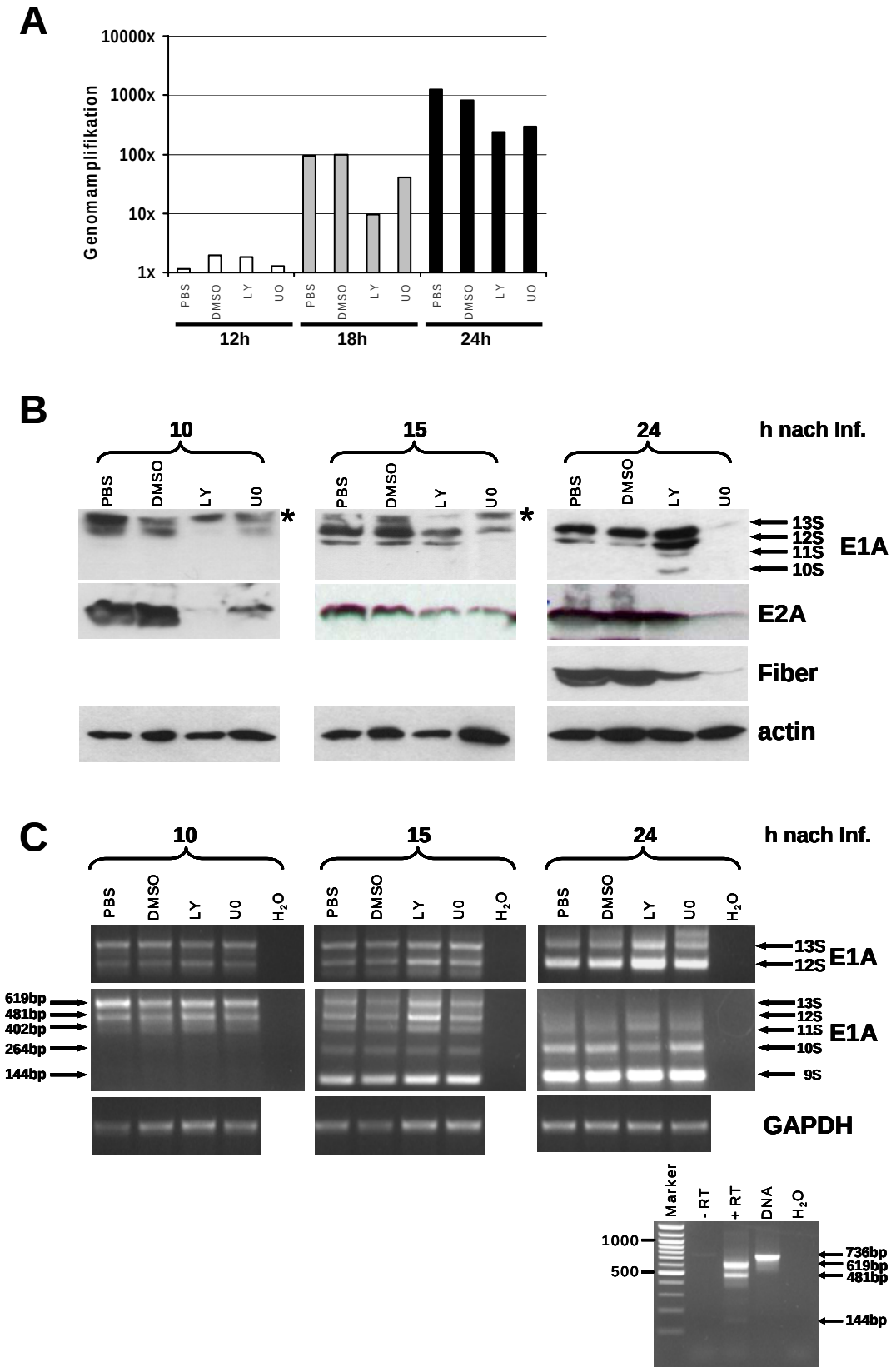


**Abb. 14. Einfluss der Inhibierung Ras-abhängiger Signalwege auf den viralen Replikationszyklus.** (A) DNA-Replikation. H1299-Zellen wurden mit 309p mit einer M. O. I. von 0,5 infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurden die Signalinhibitoren LY oder U0 sowie DMSO oder PBS wie zuvor verabreicht. 3, 12, 18 und 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet, die gesamte genomische DNA aus den Lysaten isoliert und die Menge der viralen genomischen DNA mittels semi-quantitativer real-time PCR bestimmt. Die Amplifikation der viralen Genome ergibt sich aus der Zunahme der viralen DNA-Menge zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zur viralen DNA-Menge bei 3 Stunden. (B) Proteinsynthese. H1299-Zellen wurden infiziert und behandelt wie unter A. 10, 15 und 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die Lysate mittels Western Blot analysiert. Unspezifische Hintergrundbanden sind markiert (*). (C) mRNA-Expression. H1299-Zellen wurden infiziert und behandelt wie unter A. Nicht-infizierte Kontrollzellen sind mit „mock" gekennzeichnet. 10, 15 und 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und die RNA aus den Lysaten isoliert. Die Menge der E1A- und GAPDH-Transkripte wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR bestimmt. Die verschiedenen Splicing-Formen der E1A mRNA sind angegeben. Die RNA der 10h-PBS Probe und genomische DNA wurden als Templat in einem Kontrollexperiment eingesetzt. Dieses bestätigt eine erfolgreiche reverse Transkription als Voraussetzung für die Entstehung der verschiedenen cDNA-Amplifikate und schließt deren Entstehung aus DNA-Kontaminationen aus.

Behandlung nur geringe Auswirkungen auf die Virusproteinmengen hatte (Abb. 14B). Nach 24 Stunden hingegen, in der späten Phase der Replikation, waren die Effekte vertauscht: die Blockierung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs führte zu einem dramatischen Rückgang der viralen Proteinmenge, während sich die Mengen der Virusproteine unter LY-Behandlung den Kontrollen angleichen konnten, diese im Fall von E1A sogar übertrafen.

Die Messung der DNA-Replikation ergab lediglich einen leichten Rückgang der DNA-Mengen nach Einsatz der Signalinhibitoren (Abb. 14A). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die antivirale Wirkung der Inhibitoren aus einer Hemmung der DNA-Replikation resultiert. Deshalb überprüften wir als nächstes, ob die herabgesetzten Proteinmengen eine Folge verminderter mRNA-Synthese sein könnten. Dazu wurden die Mengen der verschiedenen E1A-Transkripte mittels semi-quantitativer RT-PCR erfasst. Die Untersuchung ergab jedoch, dass die mRNA-Mengen in Gegenwart der Inhibitoren weitgehend unverändert blieben (Abb. 14C). Ein bedeutender Einfluss der Ras-Signalwege auf die virale mRNA-Synthese lässt sich daher ausschließen. Erwähnenswert ist jedoch, dass die Blockierung des PI3K/AKT-Signalwegs zu einer Verschiebung im Mengenverhältnis der einzelnen E1A-Spleißprodukte führte. Diese Beobachtung wird durch kürzlich publizierte Daten gestützt, die im Zusammenhang einer Bovinen Papillomavirus-Infektion die Regulation verschiedener Spleißfaktoren durch PI3K beschreiben (Liu et al., 2003).

Es bleibt festzuhalten, dass die Behandlung infizierter Zellen mit U0 zu einem dramatischen Rückgang sowohl der viralen Proteinmengen wie auch der

Nachkommenviren führt, ohne jedoch die virale mRNA-Synthese oder die virale DNA-Replikation nachhaltig zu beeinflussen.

### 5.8 Die Inhibierung von ERK unterbindet die Translation.

Nachdem wir Defekte in der mRNA-Synthese als Ursache für die reduzierten Proteinmengen nach U0-Behandlung ausschließen konnten, versuchten wir nun den Einfluss des Inhibitors auf die Adenovirusreplikation weiter einzugrenzen. Untersuchungen zur Replikation von Influenzaviren (Pleschka et al., 2001) hatten gezeigt, dass aktives ERK den Export viraler Ribonukleinkomplexe aus dem Zellkern unterstützt und die Verabreichung von U0 die Virusreplikation nachhaltig hemmen kann. Daher untersuchten wir den Einfluss der Ras-Signalinhibitoren auf den viralen mRNA-Export, indem wir die Kerne infizierter Zellen mittels Zellfraktionierung vom Zytoplasma trennten und die Menge viraler mRNAs in der zytoplasmatischen Fraktion bestimmten (Abb. 15A). Doch weder die Menge der E1A-, noch die der L5-Transkripte im Zytoplasma war in Gegenwart der Inhibitoren verändert. Wir schließen daher einen Einfluss der Ras-Signalwege auf den adenoviralen mRNA-Export aus. Posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, haben bekanntlich nicht nur Einfluss auf die Funktion von Proteinen, sondern können auch ihre Stabilität beeinflussen (Katagiri et al., 2005; Kim et al., 2002; Sears et al., 2000). Da E1A das Ziel zahlreicher Phosphorylierungen ist (Whalen et al., 1997) und da die U0-Behandlung auch die E1A-Mengen stark reduzierte, beschlossen wir, den Einfluss des Raf/MEK/ERK-Signalwegs auf die E1A-Stabilität zu untersuchen. Dazu wurden infizierte Zellen mit Cycloheximid behandelt und anschließend der Abbau des Proteins im Western Blot verfolgt (Abb. 15B). Das Experiment bestätigte zunächst die deutlich reduzierte E1A-Menge nach U0-Behandlung. Jedoch ließ sich kein gravierender Unterschied in der Kinetik des E1A-Abbaus feststellen. Die Ras-Signalwege scheinen also weder den adenoviralen mRNA-Export noch die Proteinstabilität – jedenfalls die von E1A – zu beeinträchtigen.

Nachdem wir also diese beiden Möglichkeiten ausschließen konnten, betrachteten wir schließlich den Einfluss des Raf/MEK/ERK-Signalwegs auf die Translation. Dazu untersuchten wir die Beladung viraler und zellulärer mRNAs mit Ribosomen in einer Polyribosomenanalyse.

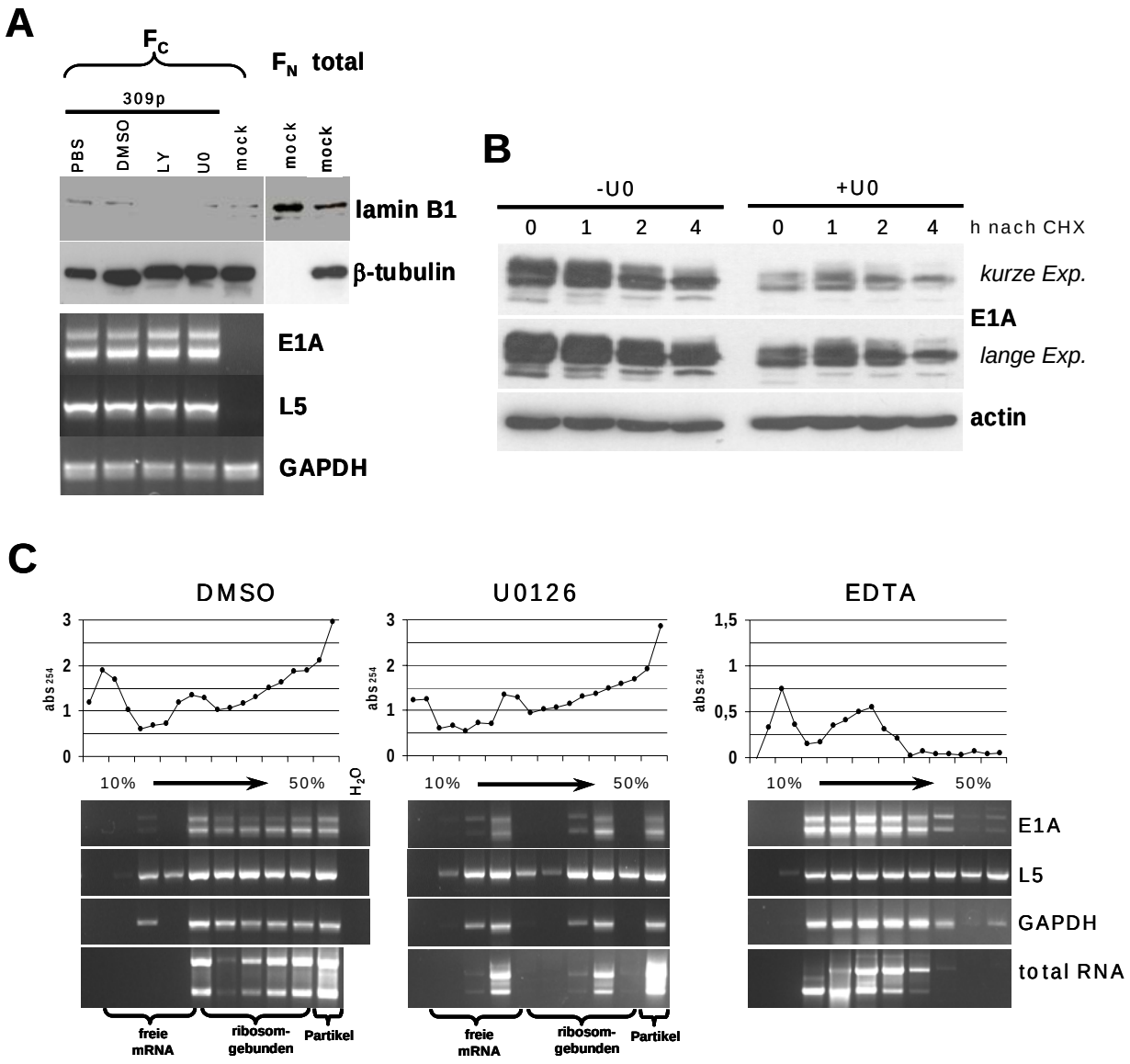



**Abb. 15. Einfluss der Ras-abhängigen Signalwege auf die virale Proteinsynthese.** (A) mRNA-Export. H1299-Zellen wurden mit 309p mit einer M. O. I. von 0,5 infiziert. Nicht-infizierte Kontrollzellen sind mit „mock" gekennzeichnet. 3 Stunden nach Infektion wurden dem Zellkulturmedium die Signalinhibitoren LY und U0, oder DMSO und PBS zugesetzt. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen geerntet und aus den Lysaten mittels Zellfraktionierung die Zellkerne ($F_N$) vom Zytoplasma ($F_C$) getrennt. Der Erfolg der Fraktionierung wurde im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die nukleären und zytoplasmatischen Markerproteine, lamin B1 und beta-tubulin, überprüft. Aus den Fraktionen wurde die RNA isoliert und die relativen Mengen der E1A-, L5- und GAPDH-Transkripte durch semi-quantitative RT-PCR bestimmt. (B) Proteinstabilität. H1299-Zellen wurden wie unter A infiziert und 3 Stunden nach Infektion mit U0 oder DMSO behandelt. 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen für 0, 1, 2 und 4 Stunden mit Cycloheximid (CHX) behandelt und dann geerntet. Die Lysate wurden im Western Blot analysiert. Um die Abbaukinetiken bei verschiedenen Proteinmengen vergleichen zu können, sind unterschiedliche Expositionszeiten gezeigt. (C) Translation. H1299-Zellen wurden wie in B infiziert und behandelt, 24 Stunden nach Infektion geerntet. Die zytoplasmatischen Extrakte der Zellen wurden wo angegeben mit EDTA behandelt und anschließend mittels Ultrazentrifugation im Dichtegradienten aufgetrennt. Die Diagramme zeigen das Absorptionsprofil der einzelnen Fraktionen bei 254nm. Aus jeweils zwei benachbarten Fraktionen wurde die RNA isoliert. Die Menge der angegebenen mRNAs in den einzelnen Fraktionen wurde nach reverser Transkription mittels semi-quantitativer RT-PCR ermittelt.

Das Experiment zeigt, dass die Behandlung infizierter Zellen mit U0 deutlich die Ribosomenassoziation viraler wie zellulärer mRNAs verändert (Abb. 15C).

Auch wenn die Menge „freier“ mRNAs klar zunimmt, führt die U0-Behandlung der Zellen jedoch keineswegs zu einer allgemeinen Dissoziation der Ribosomen von den mRNAs wie etwa in der EDTA-Kontrolle. Neben den ungebundenen Transkripten akkumulieren nun mRNAs mit einer distinkten Anzahl gebundener Ribosomen. Dies könnte das Resultat einer gestörten Elongation sein, die dazu führt, dass die Kettenverlängerung vorzeitig abbricht und dadurch die Ausbildung größerer Polyribosomen vehindert. Auch wenn wir dies nur vermuten können, bleibt festzustellen, dass die U0-Behandlung nicht nur die virale, sondern gleichermaßen die zelluläre Proteinsynthese beeinträchtigt.

Wir konnten außerdem beobachten, dass die späte virale mRNA unter U0-Behandlung wesentlich stärker mit Ribosomen beladen bleibt als die frühen viralen oder zellulären Transkripte. Das entspricht Publikationen, die eine gezielte Rekrutierung von Ribosomen an späte, virale mRNAs durch das adenovirale 100kDa-Protein beschreiben (Cuesta et al., 2000; Cuesta et al., 2004). Selbst die Behandlung des zytolplasmatischen Extrakts mit EDTA vermag die Ribosomenassoziation der L5-mRNA nur unwesentlich zu beeinträchtigen. Wie aber zuvor beschrieben (Abb. 14B), ist U0 dennoch in der Lage, die Translation der L5-mRNA effizient zu unterbinden. Diese Umstände deuten wiederum eher auf einen Defekt in der Translationselongation als in der Ribosomenbeladung, sprich der Translationsinitiation. Wir schließen also, dass die Inhibierung des MEK/ERK-Signalwegs die Virusvermehrung durch die Unterbindung der Translation verhindert.

## 5.9 Der Einfluss verschiedener ERK-abhängiger Translationsregulatoren auf die Adenovirusreplikation.

Es gibt mehrere beschriebene Möglichkeiten, wie aktives ERK in die Regulation der Translation eingreifen kann. Die wichtigsten Mechanismen sind in Abb. 16A zusammengefasst. Nachdem wir zuvor gezeigt haben, dass ERK nicht in der Lage ist, direkt mit der PKR-Aktivierung zu interferieren (Abb. 16D), können wir diesen möglichen Mechanismus bereits ausschließen. Um die übrigen Möglichkeiten zu überprüfen, haben wir die Auswirkungen der U0-Behandlung auf die potentiell beteiligten Signalproteine in infizierten Zellen untersucht. Deren Aktivität wurde dazu

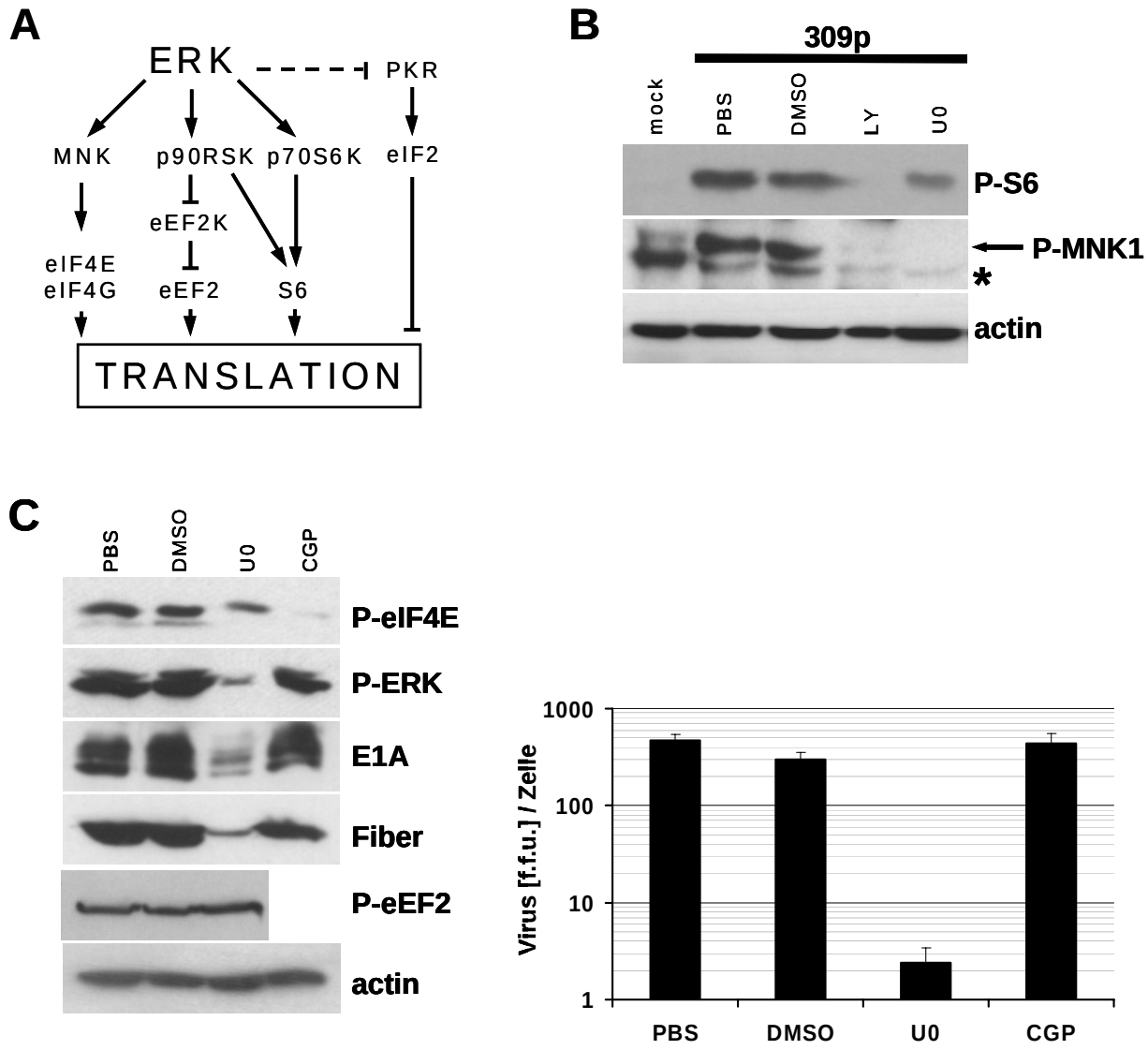



**Abb. 16. Die ERK-abhängige Regulation der Translation bei der Adenovirusinfektion.**
(A) ERK-abhängige Regulatoren der Translation. Schematische Darstellung bisher bekannter ERK-abhängiger Mechanismen zur Regulation der Translation. Die spitzen Pfeile beschreiben aktivierende Effekte, die stumpfen Pfeile reprimierende Effekte. Die gestrichelte Linie repräsentiert die postulierte Ras-abhängige Repression der PKR. eEF2, eukaryotic elongation factor 2; eEF2K, eEF2 kinase; eIF2, eukaryotic initiation factor 2; eIF4E/G, eukaryotic initiation factor 4 E and G; MNK, MAP kinase interacting kinase; p70S6K, 70kDa S6 kinases; p90RSK, 90kDa ribosomal S6 kinase; PKR, protein kinase activated by double-stranded RNA; S6, ribosomal protein S6. (B) Phosphorylierung von S6 und MNK-1. H1299-Zellen wurden mit 309p mit einer M. O. I. von 3 infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurde das Zellkulturmedium mit den Signalinhibitoren LY und U0 oder DMSO und PBS versetzt. Nicht-infizierte Kontrollzellen sind mit „mock“ gekennzeichnet. 24 Stunden nach Infektion wurden die Lysate im Western Blot analysiert. (C, D) Einfluss der Inhibierung von MNK-1 auf virale Proteinmengen und die Virusreplikation. Zur Inhibierung der MNK-1 wurden die Zellen mit CGP behandelt. Die Untersuchung der Proteine im Western Blot erfolgte wie unter B. Zur Bestimmung der Virusreplikation wurden H1299-Zellen mit 309p mit einer M. O. I. von 0,5 infiziert. 3 Stunden nach Infektion wurden U0, CGP, DMSO oder PBS zugesetzt und alle 24 Stunden erneuert. 72 Stunden nach Infektion wurde die Virusmenge durch Immunfluoreszenz-Titration ermittelt. Die Abbildung zeigt die Durchschnittswerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

mittels phosphospezifischer Antikörper im Western Blot ermittelt. ERK aktiviert zwei große Gruppen von S6-Kinasen, die p90RSKs und p70S6K I und II. Diese Kinasen sind beide in der Lage, die Translation über die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 zu regulieren. Außerdem kann p90RSK über eine weitere Kinase die Aktivität eines Elongationsfaktors der Translation, eEF2, modulieren. Unsere Experimente zeigten allerdings, dass U0 keinerlei Einfluss auf die Phosphorylierung von eEF2 hat und auch die Phosphorylierung von S6 in Gegenwart des Inhibitors allenfalls leicht reduziert wird (Abb. 16B). Zwar war LY in der Lage, die S6-Phosphorylierung nachhaltig zu reduzieren, allerdings konnte das, wie bereits gezeigt (Abb. 14B), die virale Proteinsynthese nicht wesentlich beeinträchtigen.

Eine weitere Möglichkeit der ERK-abhängigen Translationsregulation impliziert die Kinase MNK-1. Diese aktiviert die Translationsinitiationsfaktoren eIF4E und eIF4G, beide Bestandteil des Cap-bindenden Komplexes (Cuesta et al., 2000). Unsere Versuche zeigen, dass U0-Behandlung die ERK-abhängige Aktivierung der MNK-1 unterbindet (Abb. 16B), was folglich zu einer verminderten Phosphorylierung von eIF4E führt (Abb. 16B und C). Um festzustellen, ob die U0-vermittelte Reduktion der MNK- und eIF4E-Phosphorylierung verantwortlich für die eingeschränkte Proteinsynthese unter U0-Behandlung ist, haben wir uns eines weiteren spezifischen Inhibitors bedient. CGP37580 (CGP) blockiert spezifisch die MNK und wurde uns freundlicherweise von Dr. Hermann Gram (Novartis Pharma AG, Basel) zur Verfügung gestellt. Obwohl dieser Inhibitor in der eingesetzten Konzentration einwandfrei funktionierte, wie anhand des Rückgangs der eIF4E-Phosphorylierung zu sehen ist (Abb. 16C), hatte er weder Einfluss auf die virale Proteinsynthese (Abb. 16C), noch reduzierte er die Zahl der produzierten Nachkommenviren (Abb. 16D).

Keiner der in Abb. 16A beschriebenen Signalwege kann also den beobachteten Einfluss von ERK auf die Translation während einer Adenovirusinfektion erklären. Die Komplexität der zellulären Signaltransduktion lässt jedoch vermuten, dass unser Bild von der ERK-abhängigen Translationsregulation noch längst nicht vollständig ist. Daher könnte durchaus ein bislang unbekannter Zusammenhang den Effekten von U0 auf die Adenovirusreplikation zugrunde liegen. Angesichts der Tatsache, dass die zelluläre Translation während der Infektion auch durch eine Vielzahl viraler Genprodukte manipuliert wird, wäre es ebenso denkbar, dass ERK durch die Regulation eines viralen Proteins Einfluss auf die Translation nimmt.

# 6 DISKUSSION

Ziel dieser Doktorarbeit war die Herstellung und Charakterisierung onkolytischer Adenoviren mit Ras-abhängiger Replikation. Die Untersuchung der hergestellten Virusmutanten lieferte Erkenntnisse, die nicht nur Aufschluss über die tumorselektiven Wachstumseigenschaften der onkolytischen Virusmutanten geben, sondern auch neue Einblicke in die Biologie wildtypischer Adenoviren gewähren.

## 6.1 Adenoviren aktivieren Ras-abhängige Signalwege.

Die Untersuchungen zu dieser Doktorarbeit ergaben, dass bei einer Adenovirusinfektion Ras-abhängige Signalwege nicht nur – wie bisher angenommen – beim Eintritt des Virus in die Wirtszelle (Greber, 2002), sondern auch zu späten Zeitpunkten der Infektion aktiviert werden. Dabei übersteigt das Ausmaß der Phosphorylierung der zentralen Kinasen AKT und ERK in der späten Phase der Infektion bei weitem die Phosphorylierung beim Viruseintritt. Die späte AKT-Phosphorylierung wurde mittlerweile in einer Arbeit von (O'Shea et al., 2005a) bestätigt, die die Aktivierung der PI3K durch das frühe adenovirale Protein E4orf1 beschreibt. Unsere Untersuchungen zeigten, dass im Gegensatz zur Aktivierung der PI3K, zur Phosphorylierung von ERK der Eintritt in die späte Phase der Replikation erfolgt sein muss. Wir gehen deshalb davon aus, dass sich die Aktivierung der beiden Signalwege mechanistisch unterscheidet. Da in der späten Replikationsphase nicht nur die späten, strukturgebenden Virusproteine, sondern weiterhin auch die frühen Proteine exprimiert werden (Fessler and Young, 1998), kann die Zahl der für die ERK-Aktivierung in Frage kommenden Faktoren hierdurch nicht weiter eingegrenzt werden. Wir konnten jedoch feststellen, dass dem Anstieg der ERK-Phosphorylierung interessanterweise keine Aktivierung der im Signalweg vorgeschalteten Kinasen Raf und MEK vorangeht (Daten nicht gezeigt). Da die Inhibierung von MEK durch verschiedene, spezifische Inhibitoren aber trotzdem zu einem vollständigen Rückgang der ERK-Phosphorylierung führte, vermuten wir, dass adenovirale Proteine – sei es durch direkte Interaktion oder durch Inaktivierung einer Phosphatase – die Akkumulierung von phosphoryliertem ERK bewirken könnten.

## 6.2 Einfluss der Ras-Signalwege auf die Adenovirusreplikation.

### 6.2.1 PI3K/AKT

Die anschließenden Untersuchungen zur Bedeutung der späten ERK- und AKT-Phosphorylierung für die adenovirale Replikation zeigten, dass die Aktivierung der Ras-abhängigen Signalwege nicht nur ein Nebeneffekt der Infektion ist, sondern die Virusreplikation maßgeblich von ihr abhängt. Der Einsatz pharmakologischer Inhibitoren sowohl des PI3K/AKT- wie auch des Raf/MEK/ERK-Signalwegs beeinträchtigte die Virusreplikation erheblich. Die Behandlung infizierter Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (LY) bewirkte etwa einen 10fachen Rückgang des Virusertrags; diese Beobachtung konnte – auch quantitativ – von (O'Shea et al., 2005a) bestätigt werden. In unseren Experimenten verstärkte sich die replikationshemmende Wirkung von LY zusätzlich in Abwesenheit der VA-RNAs und unter Interferonbehandlung (Abb. 11C). Da der Verlust der VA-RNAs bekanntlich zur Aktivierung der PKR und infolgedessen zu einer eingeschränkten Translation führt (Thimmappaya et al., 1982), wäre aktive PI3K also in der Lage, dem PKR-vermittelten Translationsarrest entgegenzuwirken. Allerdings konnten wir in weiteren Untersuchungen einen direkten Einfluss der PI3K auf die PKR-Aktivität ausschließen (Abb. 11D). O'Shea et al. (2005a) beschreiben aber ein weiteres frühes Adenovirusprotein, E4orf4, das in Kooperation mit E4orf1 und nur nach erfolgter PI3K-Aktivierung, den zellulären Translationsregulator mTOR (mammalian target of Rapamycin) aktiviert. Dieser wiederum fördert die Proteinsynthese durch Aktivierung verschiedener Translationsfaktoren, wie z. B. eIF4E oder S6 (Hay and Sonenberg, 2004). Tatsächlich konnten wir die Reduktion der S6-Phosphorylierung nach LY-Behandlung beobachten (Abb. 16B). Aktive PI3K könnte also tatsächlich über mTOR- und S6-Aktivierung die Translation verstärken und wäre so indirekt in der Lage, den PKR-vermittelten Translationsarrest zumindest teilweise zu kompensieren.

### 6.2.2 Raf/MEK/ERK

Im Gegensatz zu den LY-abhängigen Effekten hatte die Behandlung infizierter Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 (U0) weitaus dramatischere Auswirkungen auf die Adenovirusreplikation. Selbst in Abwesenheit von Interferon war U0 in der Lage, die Vermehrung des Wildtyp-Adenovirus vollständig zu unterbinden. Dieser Effekt ließ sich durch einen weiteren, strukturell unterschiedlichen MEK-Inhibitor, SL327,

reproduzieren und resultiert daher höchstwahrscheinlich unmittelbar aus der MEK-Inhibierung. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die U0-Behandlung die Virusproteinmengen vor allem in der späten Phase der Replikation reduzierte, die mRNA-Synthese und die DNA-Replikation aber nahezu unbeeinflusst ließ. Nachdem wir eine Beeinträchtigung des mRNA-Exports oder der Proteinstabilität durch weitere Experimente ausschließen konnten, offenbarte die Untersuchung der Ribosomenassoziation viraler mRNAs eine eingeschränkte Translation als Ursache für die verminderten Proteinmengen.

Tatsächlich wurde ERK bereits in verschiedenen Szenarien als Aktivator der Translation beschrieben (Abb. 16A). Zum Beispiel kann aktives ERK die Aktivierung der Kinasen MNK-1 und MNK-2 bewirken, die ihrerseits durch Phosphorylierung die Komponenten des Cap-bindenden Komplexes, eIF4G und eIF4E, aktivieren (Cuesta et al., 2000; Waskiewicz et al., 1997). Unsere Untersuchungen ergaben zwar, dass die Gabe von U0 die Phosphorylierung von MNK-1 vollständig verhindern kann, die direkte Inhibierung der MNK-1 hatte aber im Gegensatz zu U0 keinerlei Einfluss auf die Virusreplikation. Die Aktivität der MNK-1 spielt demnach für die Adenovirusreplikation keine Rolle. Dies wird durch Untersuchungen von (Cuesta et al., 2000) bestätigt, die beschreiben, dass die Überexpression einer nicht-phosphorylierbaren eIF4E-Mutante zwar die Translation zellulärer, jedoch nicht die Translation adenoviraler mRNAs verhindern kann. Sie konnten außerdem zeigen, dass Adenoviren in der späten Phase der Replikation die Ausbildung des Cap-bindenden Komplexes durch die Wirkung des viralen 100kDa-Proteins sogar aktiv unterbinden (Cuesta et al., 2004). Wir schließen deshalb aus, dass U0 die Virusreplikation durch Inaktivierung von eIF4E oder des Cap-bindenden Komplexes verhindert.

Desweiteren ist ERK in der Lage, durch Aktivierung des Elongationsfaktors eEF2 die Translation zu verstärken (Wang et al., 2001). Wir konnten jedoch keine Veränderung der eEF2-Phosphorylierung nach U0-Behandlung infizierter Zellen feststellen.

Zum dritten kann aktives ERK durch Aktivierung der verschiedenen S6-Kinasen, p90RSK und p70S6K, die Synthese der Komponenten des Translationsapparates, inklusive aller ribosomalen Proteine und Elongationsfaktoren, verstärken (Hay and Sonenberg, 2004). Wie ihr Name schon vermuten lässt, äußert sich die Aktivität der

S6-Kinasen vor allem in der Phosphorylierung des S6-Proteins. In unseren Untersuchungen konnten wir jedoch nur nach LY-Behandlung einen deutlichen Rückgang der S6-Phosphorylierung beobachten, während sich die U0-Behandlung nur schwach negativ auswirkte. Die Effekte der Inhibitoren auf die S6-Phosphorylierung verhalten sich somit genau entgegengesetzt zur Wirkung der Inhibitoren auf die adenovirale Translation und können daher keine mechanistische Erklärung liefern.
Eine letzte Möglichkeit, den translationssteigernden Einfluss von ERK zu erklären, wäre die schon lange postulierte Inhibition der PKR (Mundschau and Faller, 1992). Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre berufen sich auf die eingeschränkte Funktion der PKR in Zellen mit mutiertem Ras, ohne jedoch die mechanistische Verknüpfung zwischen diesen beiden Proteinen beschreiben zu können (Balachandran et al., 2001; Bergmann et al., 2001; Cascallo et al., 2003; Farassati et al., 2001; Strong et al., 1998). Die Ras-abhängige Inhibition der PKR stand auch im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Doktorarbeit (s. Kap. 5.2 – 5.4). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen konnten wir allerdings keine Veränderung der PKR-Aktivität als Folge einer aktivierenden Ras-Mutation oder in Abhängigkeit der ERK-Aktivität (Farassati et al., 2001) beobachten (Abb. 9, 10B/C und 11D). Somit scheitert auch dieser Erklärungsversuch und der Einfluss von aktivem MEK bzw. ERK auf die Translation in Adenovirus-infizierten Zellen bleibt ungeklärt.

Auch wenn es uns nicht gelungen ist, den Beitrag aktiver ERK zur Adenovirusreplikation mechanistisch aufzuklären, so liefert die Beschreibung der vollständigen Unterbindung der Adenovirusreplikation durch MEK-Inhibitioren wichtige Erkenntnisse. Zum wiederholten Male konnte gezeigt werden, dass die Produktivität einer Virusinfektion maßgeblich von der erfolgreichen Manipulation wirtszelleigener Regulationsmechanismen abhängt. Besonders interessant ist die Tatsache, dass sich die Beeinflussung zellulärer Prozesse durch das Virus dabei keineswegs auf die frühe Phase der Replikation beschränkt, sondern auch in der späten Phase der Replikation offensichtlich immer noch von zentraler Bedeutung ist. Um die optimale Auslastung des zellulären Syntheseapparates zu erreichen, muss es dem Virus gelingen, die infizierte Wirtszelle im Laufe der Infektion in der S-Phase des Zellzyklus zu arretieren. Der Raf/MEK/ERK-Signalweg, als einer der wichtigsten Mediatoren proliferativer Signale, könnte dabei eine entscheidende Rolle spielen.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die adenovirale Replikation aber nicht nur indirekt durch eine gesteigerte Proliferation der Wirtszelle, sondern vor allem direkt durch die Regulation der viralen Translation an die Aktivierung dieses Signalwegs gekoppelt ist. Interessanterweise zeigten kürzliche Untersuchungen zur Replikation von Adenoviren in ruhenden Zellen, dass die Zahl der Nachkommenviren – verglichen zur Situation in proliferierenden Zellen – maßgeblich durch eine eingeschränkte Synthese der späten Virusproteine reduziert wird (Vaillancourt et al., 2005). Der von uns beschriebene Einfluss von ERK auf die virale Translation könnte hier eine plausible mechanistische Erklärung liefern.

Die zentrale Rolle des Raf/MEK/ERK-Signalwegs in der Wachstumsregulation führte zu der Idee, die Replikation von Tumorzellen gezielt durch die Inhibierung der einzelnen Kinasen zu unterbinden. Zu diesem Zweck werden momentan zahlreiche, selektive Substanzen auf ihre signalinhibierende Wirkung, z. T. sogar schon in klinischen Studien, untersucht. (Sebolt-Leopold and Herrera, 2004). Die Erkenntnis, dass die Replikation zahlreicher Viren essentiell von der Integrität des Raf/MEK/ERK-Signalwegs abhängt, eröffnet nunmehr die Möglichkeit, genau diese, gegebenenfalls sogar klinisch erprobten Substanzen, zur Behandlung viraler Infektionen einzusetzen. Entsprechende Wirksamkeitsstudien mit verschiedenen Viren, wie z. B. Influenza, zeigten *in vitro* bereits vielversprechende Ergebnisse (Jiang et al., 2004; Johnson et al., 2001; Luo et al., 2002; Planz et al., 2001; Pleschka et al., 2001). Der Einsatz von MEK-Inhibitoren wäre unseren Ergebnissen zufolge also auch bei einer Adenovirusinfektion denkbar, z. B. in Augentropfen bei der weit verbreiteten Keratokonjunktivitis epidemica.

Die starke Abhängigkeit der Replikation vieler Viren von aktiven Ras-Signalwegen bietet aber nicht nur Ansatzpunkte zur Therapie viraler Infektionen, sondern begründet zugleich einen vielversprechenden Ansatz zur Krebstherapie, die Virus-vermittelte Onkolyse.

## 6.3 Adenovirale Onkolyse: Ras-abhängige Replikation VA-RNA-loser Adenoviren.

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Untersuchungen das selektive Wachstum verschiedener PKR-sensitiver Viren in Zellen mit aktiviertem Ras als Möglichkeit zur gezielten, Virus-vermittelten Onkolyse beschrieben (Balachandran et al., 2001; Bergmann et al., 2001; Farassati et al., 2001; Strong et al., 1998). In dieser Doktorarbeit wollten wir daher überprüfen, ob das Konzept der Ras-abhängigen Replikation auch auf Adenoviren übertragbar wäre. Zu diesem Ziel generierten wir eine Gruppe isogenischer, VA-RNA-defizienter Adenoviren und untersuchten ihr Wachstumsverhalten in verschiedenen Zellen und Zelllinien mit unterschiedlichem Ras-Status (Abb. 8). Tatsächlich zeigten PKR-sensitive Adenoviren in Ras-transformierten Zellen unterschiedlichster Herkunft eine signifikant erhöhte Replikationsfähigkeit gegenüber Ras-wildtypischen Zellen. Zwischenzeitlich zeigten (Cascallo et al., 2003), dass das Wachstum VA-RNA I-loser Adenoviren in Zellen aus Pankreastumoren spezifisch von der Aktivität der Ras-Signalwege abhängt. Wir konnten während unserer Untersuchungen allerdings verschiedene Beobachtungen machen, die einen direkten Einfluss von mutiertem Ras auf die PKR-Aktivität in Frage stellen.

### 6.3.1 PKR-Aktivierung trotz mutiertem Ras

Auch wenn die allgemeine Replikationseffizienz VA-RNA I-loser Adenoviren in Ras-transformierten Zellen erhöht war, fanden wir doch einige Ras-transformierte Zellen, die trotz vorhandener Ras-Mutation die Replikation der Virusmutanten eindeutig nicht unterstützten (z. B. NCI-H1373, PANC-1 oder HT-1080 6TG). Diese Ausnahmen ließen erste Zweifel an der unmittelbaren Abhängigkeit der Replikationsfähigkeit VA-RNA I-loser Viren von mutiertem Ras aufkommen. Weitere Untersuchungen in einem isogenischen Zellpaar mit unterschiedlichem Ras-Status bestätigten diesen Verdacht: die Gegenwart eines aktivierten Ras-Onkogens hatte weder Einfluss auf die Virusreplikation, noch auf die Phosphorylierung des PKR-Substrats eIF2$\alpha$ (Abb. 10). Endogenes, mutiertes Ras scheint daher weder auszureichen, die PKR-Aktivität wirkungsvoll zu inhibieren, noch die produktive Replikation PKR-sensitiver Viren grundsätzlich zu gewährleisten.

Überraschenderweise zeigte die Untersuchung der dVA-permissiven Zelllinie, NCI-H1299, dass die produktive Replikation der VA-RNA-losen Viren in Gegenwart von phosphoryliertem eIF2$\alpha$ stattfand (Abb. 9A). Transfektionsexperimente mit synthetischer, doppelsträngiger RNA bestätigten, dass die PKR in diesen Zellen trotz Ras-Mutation aktivierbar bleibt (Abb. 9B). Die Permissivität dieser Zellen für VA-RNA-lose Viren resultiert also offensichtlich nicht aus der Expression eines PKR-Inhibitors. Vielmehr scheinen diese Zellen Möglichkeiten entwickelt zu haben, den PKR-vermittelten Translationsarrest zu überwinden. Diese Feststellung deckt sich mit Beobachtungen von (Balachandran et al., 2001), die die produktive Replikation onkolytischer VSV in transformierten Zellen ebenfalls trotz aktiver PKR und phosphoryliertem eIF2$\alpha$ beschreiben.

Ein weiterer Hinweis gegen die Ras-vermittelte Expression eines PKR-Inhibitors war, dass Adenoviren während der Infektion selbst für eine nachhaltige Aktivierung der wichtigsten Ras-abhängigen Signalwege, Raf/MEK/ERK und PI3K/AKT, sorgen (Abb. 12). Die Aktivierung erfolgt unabhängig vom Ras-Status der Wirtszelle und auch nach Infektion mit VA-RNA I-losen Virusmutanten (Daten nicht gezeigt). Es ist daher unwahrscheinlich, dass mutiertes Ras während der Adenovirusinfektion einen entscheidenden Beitrag zur Aktivierung dieser Signalwege leistet. Gleichzeitig ist eine Beteiligung der Signalwege an der Induktion des postulierten PKR-Inhibitors unwahrscheinlich, da es wenig plausibel erscheint, dass PKR-sensitive Adenoviren genau die Signalwege aktivieren, auf die sich ihre selektive Replikationsfähigkeit gründet. Unsere Experimente mit pharmakologischen Inhibitoren zur Blockierung der beiden Signalwege bestätigten dies. Die Inhibitoren hatten unter verschiedenen PKR-aktivierenden Bedingungen keinerlei Einfluss auf die Phosporylierung von eIF2$\alpha$. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten auch (Strong et al., 1998) in Reovirus-infizierten Zellen. Sie konnten zeigen, dass die Gabe eines MEK-Inhibitors nicht ausreicht, die PKR-Inaktivierung in Ras-transformierten Zellen aufzuheben.
All diese Hinweise reichen zwar nicht aus, um die Existenz eines Ras-induzierbaren PKR-Inhibitors auszuräumen, sie zeigen allerdings, dass es zur erfolgreichen Replikation PKR-sensitiver Viren nicht unbedingt der direkten Inaktivierung der PKR durch Ras bedarf. Sie zeigen zudem, dass mutiertes Ras nicht notwendigerweise einen dVA-permissiven Phänotyp verursacht.

Dennoch demonstrierten (Cascallo et al., 2003), dass der Wachstumsdefekt PKR-sensitiver Adenoviren unmittelbar durch die Aktivität von mutiertem Ras – und mutmaßlich durch die Inaktivierung der PKR – ausgeglichen werden kann. Diese Ergebnisse entstanden allerdings nach Überexpression, also in Gegenwart unphysiologisch hoher Mengen von aktivem Ras und wahrscheinlich auch aktiver ERK. Wir geben zu bedenken, dass die Aktivität des Raf/MEK/ERK-Signalwegs – unabhängig von der PKR-Aktivität – von entscheidender Bedeutung für die adenovirale Proteinsynthese ist. Wir konnten zeigen, dass die Proteinsynthese in infizierten Zellen unmittelbar mit dem Grad der ERK-Phosphorylierung korreliert und der Einsatz verschiedener, spezifischer MEK-Inhibitoren umgekehrt zu einer nachhaltigen Beeinträchtigung der Virusvermehrung aufgrund einer eingeschränkten Translation führt. Aktives ERK könnte also die Translation derart gesteigert haben, dass der PKR-vermittelte Translationsarrest überwunden werden konnte, allerdings ohne die PKR direkt zu inhibieren. Die erhaltenen Ergebnisse sollten daher unter Berücksichtigung dieses Zusammenhangs überprüft werden.

### 6.3.2 Die Ras-abhängige Transformation

Die Simulierung des Zustands einer Ras-transformierten Zelle durch die Überexpression von aktivem Ras birgt aber nicht nur das Risiko unerwünschter Sekundäreffekte, sondern spiegelt die physiologische Situation unter Umständen völlig falsch wider. Untersuchungen an Ras-transformierten Zellen haben in den letzten Jahren zu einer veränderten Vorstellung vom Einfluss aktivierender Ras-Mutationen auf die nachfolgenden Signalwege geführt. So konnte gezeigt werden, dass aktivierende Ras-Mutationen keineswegs – wie bisher angenommen – zu einer konstitutiven Aktivierung des Raf/MEK/ERK-Signalwegs führen müssen (Giehl et al., 2000; Iida et al., 1999; Stofega et al., 1997; Yip-Schneider et al., 1999). Stattdessen kann es der betroffenen Zelle anscheinend gelingen, die dauerhafte Stimulierung der Signalwege, z. B. durch die Überexpression von Phosphatasen, abzustellen (Yip-Schneider et al., 2001). Auch wir konnten bestätigen, dass Ras-mutierte Zelllinien, wie H1299 oder A549, keine maximale ERK- oder AKT-Phosphorylierung besitzen, sondern durchaus noch in der Lage sind, ERK oder AKT in Abhängigkeit von der Serumkonzentration im Kulturmedium differentiell zu phosphorylieren (Daten nicht gezeigt). Transformierte Zellen mit mutiertem Ras besitzen also nicht unbedingt dauerhaft aktivierte Signalwege und die Überexpression von aktiviertem Ras kann

diesem Umstand nicht gerecht werden. Aus diesem Grund haben wir sowohl auf *in vitro* transformierte Zellen, wie NIH-3T3 (Strong et al., 1998) oder 518 (Bergmann et al., 2001), als auch auf transiente Ansätze mit überexprimiertem Ras verzichtet. Wir haben stattdessen einerseits „natürlich“ transformierte Zelllinien betrachtet und diese gegebenenfalls mit Signalinhibitoren behandelt oder isogenische Zellen verwendet, in denen das mutierte Ras-Allel nachträglich entfernt – und nicht nachträglich eingebracht – worden war.
Auch wenn unsere Ergebnisse schwere Zweifel am bislang postulierten Mechanismus der Ras-abhängigen Onkolyse aufkommen lassen, konnten wir dennoch beobachten, dass die Permissivität von Tumorzellen für die Replikation VA-RNA I-loser Adenoviren in Gegenwart aktivierender Ras-Mutationen trotz der beschriebenen Ausnahmen dennoch signifikant erhöht ist. Während das Prinzip der Ras-abhängigen Replikation also weiterhin Bestand hat, stellt sich die Frage nach den mechanistischen Grundlagen aufs Neue. Nachdem wir einen direkten Einfluss von mutiertem Ras auf die PKR-Aktivität und die Permissivität für VA-RNA-lose Viren weitestgehend ausschließen konnten, ist ein indirekter Zusammenhang wahrscheinlich.

In letzter Zeit mehrten sich Berichte, die eine effiziente Virusreplikation in Gegenwart von aktiver PKR und trotz der Phosphorylierung von eIF2$\alpha$ beschreiben (Balachandran and Barber, 2004; Balachandran et al., 2001; Langland and Jacobs, 2004). Insbesondere in transformierten Zellen ist phosphoryliertes eIF2$\alpha$ demzufolge oft nicht in der Lage, die Ausbreitung einer Virusinfektion wirksam zu unterbinden. Es scheint, als besäßen diese Zellen die Eigenschaft, den PKR-vermittelten Translationsarrest zu unterlaufen und so die effiziente Synthese viraler Proteine zu gestatten.

Diese Beobachtungen legen daher den Schluss nahe, dass Ereignisse während der Ras-abhängigen Transformation die Tumorzellen speziell empfänglich für die Infektion mit PKR-sensitiven Viren machen. Es ist bekannt, dass die alleinige Expression von mutiertem Ras in primären Zellen keine Transformation hervorruft, sondern einen irreversiblen Zellzyklusarrest – die premature Seneszenz – auslöst (Lin et al., 1998; Serrano et al., 1997). Erst in Kooperation mit anderen Onkogenen ist aktiviertes Ras in der Lage, einen vollständig transformierten Phänotyp in

primären Zellen hervorzurufen (Boehm et al., 2005; Carnero and Beach, 2004; Hahn et al., 1999; Voorhoeve and Agami, 2004). Dieses Modell der Krebsentstehung besagt, dass die Ras-abhängige Transformation einer Zelle Sekundärmutationen erfordert, die ihrerseits die Seneszenzentstehung verhindern. Eben diese Sekundärmutationen könnten ausschlaggebend für die gesteigerte Permissivität von Tumorzellen gegenüber PKR-sensitiven Viren sein. Die Charakterisierung solcher Sekundärmutationen könnte daher wichtige Erkenntnisse zu möglichen Überschneidungen zwischen antitumoralen und antiviralen Mechanismen der Zelle liefern.

### 6.3.3 PKR-abhängige Signalwege und premature Seneszenz

Im Zusammenhang mit der Replikation PKR-sensitiver, onkolytischer Viren stellt sich die Frage, ob die PKR oder PKR-abhängige Signalwege an der Ausbildung der Seneszenz beteiligt und daher das Ziel transformierender Sekundärmutationen sein könnten. Tatsächlich wurden der PKR in der Vergangenheit tumorsupprimierende Eigenschaften zugesprochen. So konnte gezeigt werden, dass die Expression dominant-negativer PKR die zelluläre Transformation begünstigen kann (Donze et al., 1995; Koromilas et al., 1992). In anderen Untersuchungen waren E3L und NS5A, die PKR-Antagonisten der Vaccinia und Hepatitis C Viren, in der Lage, Zellen zu transformieren (Gimenez-Barcons et al., 2005) oder gar mit onkogenem H-Ras in der Transformation von Fibroblasten zu kooperieren (Garcia et al., 2002). Die Aufklärung, welche Funktionen der PKR ihre antitumoralen Eigenschaften begründen, könnte also von entscheidender Bedeutung für die Aufklärung der Ras-abhängigen Replikation PKR-sensitiver Viren sein.

Die bekannteste Funktion der PKR ist die Regulation der Translation. Auch wenn die Rolle der Translationsregulation speziell im Zusammenhang mit der Ras-abhängigen Transformation noch nicht untersucht wurde, gibt es starke Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen deregulierter Translation und Krebsentstehung (Pandolfi, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Translationsfaktoren in Tumorzellen überexprimiert werden: eIF2$\alpha$, eIF4E (Rosenwald, 1996), eIF2Bgamma und epsilon (Balachandran and Barber, 2004). Myc, eines der bekanntesten Onkogene, die mit Ras in der Transformation von Zellen kooperieren (Carnero and Beach, 2004), ist für die Überexpression von eIF2 und eIF4E verantwortlich

(Rosenwald et al., 1993). Wir haben daher die Expression mehrerer Translationsfaktoren in einer repräsentativen Gruppe der in dieser Doktorarbeit verwendeten Zelllinien miteinander verglichen (Daten nicht gezeigt). Auch wenn diese Proteine in den transformierten Zellen häufig überexprimiert waren, ergab sich jedoch kein klarer Zusammenhang zwischen dem Expressionsmuster eines jeden Proteins und der Permissivität für VA-RNA-lose Viren. Die Überexpression einzelner Translationsfaktoren könnte also durchaus für die erhöhte Empfänglichkeit einzelner Zellen gegenüber PKR-sensitiven Viren verantwortlich sein, jedoch lässt sich keine verallgemeinerbare Verbindung zwischen dem Ras-Status und der Permissivität einer Zelle ableiten. Zu derselben Erkenntnis gelangten auch (Balachandran and Barber, 2004), die den Einfluss der Überexpression von eIF2Bepsilon in transformierten Zellen auf die Replikation onkolytischer Vesikulärer Stomatitis Viren untersuchten: die Überexpression einzelner Schlüsselenzyme des Translations-apparates könnte ausreichen, den PKR-vermittelten Translationsarrest effektiv zu unterlaufen. Ob die Deregulation der Translation dazu beitragen kann, die Ras-induzierte Seneszenz zu überwinden, oder ob sie lediglich eine Begleiterscheinung der zellulären Transformation darstellt, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Ein entscheidender Schritt bei der Ausbildung der Ras-induzierten Seneszenz ist die Aktivierung des MKK3/6-p38-Signalwegs (Wang et al., 2002). Die Blockierung einzelner Komponenten dieser Signalkaskade reicht aus, um die Seneszenzinduktion zu verhindern. In Gegenwart von Interferon führt die Aktivierung desselben Signalwegs durch die PKR zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (Meusel and Imani, 2003) und bildet so einen wichtigen Arm der antiviralen Antwort. Die Selektion für Defekte im MKK3/6-p38-Signalweg im Zuge der Ras-induzierten Transformation könnte also zugleich die Permissiviät für Interferon-sensitive Viren steigern. Unsere Untersuchungen ergaben, dass die Infektion mit Adenoviren tatsächlich eine Aktivierung des p38-Signalwegs hervorruft (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnten wir keinen Unterschied zwischen einer Wildtyp- und einer dVA-Infektion feststellen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Ras-spezifische Replikation VA-RNA-loser Adenoviren auf Defekte im p38-Signalweg zurückzuführen ist.

Einen wichtigen Hinweis auf die tumorsupprimierenden Eigenschaften der PKR könnte die Beobachtung geben, dass die PKR-vermittelte Apoptoseinduktion nach Transfektion doppelsträngiger RNA in einigen Tumorzellen gestört ist (Friedrich et al., 2005). Interessanterweise konnten wir feststellen, dass der Defekt der PKR-induzierten Apoptose mit erhöhter Permissivität für VA-RNA-lose Viren einhergeht. PKR induziert Apoptose einerseits durch die Inhibition der Translation, andererseits aber auch durch die Aktivierung verschiedener apoptotischer Signalwege (Gil and Esteban, 2000). Neben der p38-abhängigen Induktion von NFkappaB, die zur verstärkten Expression pro-apoptotischer Faktoren wie p53, Fas oder Bax führt, löst die PKR eine Rezeptor-unabhängige Aktivierung FADD-abhängiger Caspasen aus. Ähnlich wie bereits für den p38-Signalweg beschrieben, ist die PKR-abhängige Aktivierung der Caspase-Kaskaden aber nicht ausschließlich der Apoptoseinduktion vorbehalten, sondern ist gleichermaßen an der Ausbildung der prematuren Seneszenz beteiligt (Ohshima, 2004; Unterluggauer et al., 2003) und auch Bestandteil der antiviralen Antwort (Balachandran et al., 2000). Wir formulieren daher die Hypothese, dass die PKR ein zentraler Regulator gemeinsamer Signalwege der Virusabwehr, der Apoptose und der prematuren Seneszenz ist. Die Veränderung eines jeden dieser Signalwege im Zuge der Ras-abhängigen Transformation hätte daher automatisch die Beeinträchtigung der anderen Prozesse zur Folge. Die Erforschung der Zusammenhänge der bisher isoliert betrachteten Abläufe der Virusabwehr, Apoptose und der Seneszenzinduktion könnte daher maßgeblich zur Aufklärung der Grundlagen der Ras-abhängigen Replikation onkolytischer Viren beitragen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass das Prinzip der Ras-abhängigen Replikation erfolgreich auf onkolytische Adenoviren übertragen werden konnte. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit verdeutlichen aber, dass die der tumorspezifischen Replikation zugrunde liegenden Mechanismen allerdings noch weiterer Aufklärung bedürfen. Wir konnten zeigen, dass das Vorhandensein aktivierender Ras-Mutationen kein zuverlässiger Indikator zur Bestimmung der Permissivität von Tumorzellen für die Replikation PKR-sensitiver Viren ist. Gleichzeitig stellten wir fest, dass Ras-abhängige Signalwege während der Infektion gezielt von Adenoviren manipuliert werden und ihre Aktivierung – auch PKR-unabhängig – von entscheidender Bedeutung für die virale Translation ist. Solange die

Zusammenhänge zwischen Ras-abhängiger Signaltransduktion und Ras-abhängiger Transformation und ihr Einfluss auf die Replikation onkolytischer Viren nicht besser verstanden sind, raten wir daher zu großer Vorsicht bei der Anwendung PKR-sensitiver Viren zur Krebstherapie.

# 7 Literatur

Balachandran, S. and Barber, G.N. (2004) Defective translational control facilitates vesicular stomatitis virus oncolysis. *Cancer Cell*, **5**, 51-65.

Balachandran, S., Porosnicu, M. and Barber, G.N. (2001) Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J Virol*, **75**, 3474-3479.

Balachandran, S., Roberts, P.C., Kipperman, T., Bhalla, K.N., Compans, R.W., Archer, D.R. and Barber, G.N. (2000) Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. *J Virol*, **74**, 1513-1523.

Bell, J.C., Lichty, B. and Stojdl, D. (2003) Getting oncolytic virus therapies off the ground. *Cancer Cell*, **4**, 7-11.

Bergmann, M., Romirer, I., Sachet, M., Fleischhacker, R., Garcia-Sastre, A., Palese, P., Wolff, K., Pehamberger, H., Jakesz, R. and Muster, T. (2001) A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties. *Cancer Res*, **61**, 8188-8193.

Bett, A.J., Krougliak, V. and Graham, F.L. (1995) DNA sequence of the deletion/insertion in early region 3 of Ad5 dl309. *Virus Res*, **39**, 75-82.

Bhat, R.A. and Thimmappaya, B. (1984) Adenovirus mutants with DNA sequence perturbations in the intragenic promoter of VAI RNA gene allow the enhanced transcription of VAII RNA gene in HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, **12**, 7377-7388.

Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. and McCormick, F. (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-376.

Boehm, J.S., Hession, M.T., Bulmer, S.E. and Hahn, W.C. (2005) Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Mol Cell Biol*, **25**, 6464-6474.

Bos, J.L. (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, **49**, 4682-4689.

Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, **2**, 243-247.

Carnero, A. and Beach, D.H. (2004) Absence of p21WAF1 cooperates with c-myc in bypassing Ras-induced senescence and enhances oncogenic cooperation. *Oncogene*, **23**, 6006-6011.

Cascallo, M., Capella, G., Mazo, A. and Alemany, R. (2003) Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant. *Cancer Res*, **63**, 5544-5550.

Chang, F., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R. and McCubrey, J.A. (2003) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int J Oncol*, **22**, 469-480.

Chiocca, E.A. (2002) Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer*, **2**, 938-950.

Cohen, E.E. and Rudin, C.M. (2001) ONYX-015. Onyx Pharmaceuticals. *Curr Opin Investig Drugs*, **2**, 1770-1775.

Cuesta, R., Xi, Q. and Schneider, R.J. (2000) Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *Embo J*, **19**, 3465-3474.

Cuesta, R., Xi, Q. and Schneider, R.J. (2004) Structural basis for competitive inhibition of eIF4G-Mnk1 interaction by the adenovirus 100-kilodalton protein. *J Virol*, **78**, 7707-7716.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R. and Futreal, P.A. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **417**, 949-954.

De Page, N.G. (1912) Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del callo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia*, 82-88.

Dey, M., Cao, C., Dar, A.C., Tamura, T., Ozato, K., Sicheri, F. and Dever, T.E. (2005) Mechanistic Link between PKR Dimerization, Autophosphorylation, and eIF2alpha Substrate Recognition. *Cell*, **122**, 901-913.

Dix, B.R., Edwards, S.J. and Braithwaite, A.W. (2001) Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J Virol*, **75**, 5443-5447.

Dobbelstein, M. (2004) Replicating adenoviruses in cancer therapy. *Curr Top Microbiol Immunol*, **273**, 291-334.

Donze, O., Jagus, R., Koromilas, A.E., Hershey, J.W. and Sonenberg, N. (1995) Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells. *Embo J*, **14**, 3828-3834.

Farassati, F., Yang, A.D. and Lee, P.W. (2001) Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol*, **3**, 745-750.

Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A., Magolda, R.L., Scherle, P.A. and Trzaskos, J.M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, **273**, 18623-18632.

Fessler, S.P. and Young, C.S. (1998) Control of adenovirus early gene expression during the late phase of infection. *J Virol*, **72**, 4049-4056.

Friedrich, I., Eizenbach, M., Sajman, J., Ben-Bassat, H. and Levitzki, A. (2005) A cellular screening assay to test the ability of PKR to induce cell death in mammalian cells. *Mol Ther*.

Garcia, M.A., Guerra, S., Gil, J., Jimenez, V. and Esteban, M. (2002) Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L. *Oncogene*, **21**, 8379-8387.

Ghadge, G.D., Swaminathan, S., Katze, M.G. and Thimmapaya, B. (1991) Binding of the adenovirus VAI RNA to the interferon-induced 68-kDa protein kinase correlates with function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7140-7144.

Giehl, K., Skripczynski, B., Mansard, A., Menke, A. and Gierschik, P. (2000) Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene*, **19**, 2930-2942.

Gil, J. and Esteban, M. (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*, **5**, 107-114.

Gimenez-Barcons, M., Wang, C., Chen, M., Sanchez-Tapias, J.M., Saiz, J.C. and Gale, M., Jr. (2005) The oncogenic potential of hepatitis C virus NS5A sequence variants is associated with PKR regulation. *J Interferon Cytokine Res*, **25**, 152-164.

Gingras, M.C., Arevalo, P. and Aguilar-Cordova, E. (1996) Potential salmon sperm origin of the E3 region insert of the adenovirus 5 dl309 mutant. *Cancer Gene Ther*, **3**, 151-154.

Goodrum, F.D. and Ornelles, D.A. (1998) p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol*, **72**, 9479-9490.

Greber, U.F. (2002) Signalling in viral entry. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 608-626.

Guilfoyle, R. and Weinmann, R. (1981) Control region for adenovirus VA RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 3378-3382.

Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-468.

Hall, A.R., Dix, B.R., O'Carroll, S.J. and Braithwaite, A.W. (1998) p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat Med*, **4**, 1068-1072.

Hancock, J.F. (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 373-384.

Hann, B. and Balmain, A. (2003) Replication of an E1B 55-kilodalton protein-deficient adenovirus (ONYX-015) is restored by gain-of-function rather than loss-of-function p53 mutants. *J Virol*, **77**, 11588-11595.

Harada, J.N. and Berk, A.J. (1999) p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol*, **73**, 5333-5344.

Harvey, J.J. (1964) An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature*, **204**, 1104-1105.

Hawk, M.A., Cesen, K.T., Siglin, J.C., Stoner, G.D. and Ruch, R.J. (1996) Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Lett*, **109**, 217-222.

Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, **18**, 1926-1945.

He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2509-2514.

Huebner, R.J., Rowe, W.P., Schatten, W.E., Smith, R.R. and Thomas, L.B. (1956) Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer*, **9**, 1211-1218.

Iida, M., Towatari, M., Nakao, A., Iida, H., Kiyoi, H., Nakano, Y., Tanimoto, M., Saito, H. and Naoe, T. (1999) Lack of constitutive activation of MAP kinase pathway in human acute myeloid leukemia cells with N-Ras mutation. *Leukemia*, **13**, 585-589.

Jiang, S.J., Lin, T.M., Shi, G.Y., Eng, H.L., Chen, H.Y. and Wu, H.L. (2004) Inhibition of bovine herpesvirus-4 replication by arsenite through downregulation of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Biomed Sci*, **11**, 500-510.

Johnson, R.A., Ma, X.L., Yurochko, A.D. and Huang, E.S. (2001) The role of MKK1/2 kinase activity in human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol*, **82**, 493-497.

Katagiri, C., Masuda, K., Urano, T., Yamashita, K., Araki, Y., Kikuchi, K. and Shima, H. (2005) Phosphorylation of Ser-446 determines stability of MKP-7. *J Biol Chem*, **280**, 14716-14722.

Kerkhoff, E. and Rapp, U.R. (1997) Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol*, **17**, 2576-2586.

Kim, G.Y., Mercer, S.E., Ewton, D.Z., Yan, Z., Jin, K. and Friedman, E. (2002) The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation. *J Biol Chem*, **277**, 29792-29802.

Kirn, D. (2001) Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials. *Expert Opin Biol Ther*, **1**, 525-538.

Kitajewski, J., Schneider, R.J., Safer, B., Munemitsu, S.M., Samuel, C.E., Thimmappaya, B. and Shenk, T. (1986a) Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell*, **45**, 195-200.

Kitajewski, J., Schneider, R.J., Safer, B. and Shenk, T. (1986b) An adenovirus mutant unable to express VAI RNA displays different growth responses and sensitivity to interferon in various host cell lines. *Mol Cell Biol*, **6**, 4493-4498.

Koch, P., Gatfield, J., Lober, C., Hobom, U., Lenz-Stoppler, C., Roth, J. and Dobbelstein, M. (2001) Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. *Cancer Res*, **61**, 5941-5947.

Koromilas, A.E., Roy, S., Barber, G.N., Katze, M.G. and Sonenberg, N. (1992) Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase. *Science*, **257**, 1685-1689.

Langland, J.O. and Jacobs, B.L. (2004) Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N- and C-terminal domains of E3L. *Virology*, **324**, 419-429.

Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M. and Lowe, S.W. (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*, **12**, 3008-3019.

Liu, X., Mayeda, A., Tao, M. and Zheng, Z.M. (2003) Exonic splicing enhancer-dependent selection of the bovine papillomavirus type 1 nucleotide 3225 3' splice site can be rescued in a cell lacking splicing factor ASF/SF2 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Virol*, **77**, 2105-2115.

Lowy, D.R. and Willumsen, B.M. (1993) Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem*, **62**, 851-891.

Luo, H., Yanagawa, B., Zhang, J., Luo, Z., Zhang, M., Esfandiarei, M., Carthy, C., Wilson, J.E., Yang, D. and McManus, B.M. (2002) Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Virol*, **76**, 3365-3373.

Ma, Y. and Mathews, M.B. (1996) Structure, function, and evolution of adenovirus-associated RNA: a phylogenetic approach. *J Virol*, **70**, 5083-5099.

Malmgaard, L. (2004) Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res*, **24**, 439-454.

Malumbres, M. and Pellicer, A. (1998) RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci*, **3**, d887-912.

Markert, J.M., Malick, A., Coen, D.M. and Martuza, R.L. (1993) Reduction and elimination of encephalitis in an experimental glioma therapy model with attenuated herpes simplex mutants that retain susceptibility to acyclovir. *Neurosurgery*, **32**, 597-603.

Martuza, R.L., Malick, A., Markert, J.M., Ruffner, K.L. and Coen, D.M. (1991) Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*, **252**, 854-856.

Meusel, T.R. and Imani, F. (2003) Viral induction of inflammatory cytokines in human epithelial cells follows a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent but NF-kappa B-independent pathway. *J Immunol*, **171**, 3768-3774.

Mitsudomi, T., Steinberg, S.M., Nau, M.M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Minna, J.D. and et al. (1992) p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*, **7**, 171-180.

Mitsudomi, T., Viallet, J., Mulshine, J.L., Linnoila, R.I., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. (1991) Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene*, **6**, 1353-1362.

Modrow, S., Falke, D. and Truyen, U. (2001) *Molekulare Virologie*. Spektrum Verlag.

Mundschau, L.J. and Faller, D.V. (1992) Oncogenic ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 alpha-kinase activation. *J Biol Chem*, **267**, 23092-23098.

Norman, K.L., Coffey, M.C., Hirasawa, K., Demetrick, D.J., Nishikawa, S.G., DiFrancesco, L.M., Strong, J.E. and Lee, P.W. (2002) Reovirus oncolysis of human breast cancer. *Hum Gene Ther*, **13**, 641-652.

Norman, K.L. and Lee, P.W. (2005) Not all viruses are bad guys: the case for reovirus in cancer therapy. *Drug Discov Today*, **10**, 847-855.

O'Shea, C., Klupsch, K., Choi, S., Bagus, B., Soria, C., Shen, J., McCormick, F. and Stokoe, D. (2005a) Adenoviral proteins mimic nutrient/growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication. *Embo J*, **24**, 1211-1221.

O'Shea, C.C., Soria, C., Bagus, B. and McCormick, F. (2005b) Heat shock phenocopies E1B-55K late functions and selectively sensitizes refractory tumor cells to ONYX-015 oncolytic viral therapy. *Cancer Cell*, **8**, 61-74.

Ohshima, S. (2004) Apoptosis in stress-induced and spontaneously senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **324**, 241-246.

Osaki, M., Oshimura, M. and Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, **9**, 667-676.

Pandolfi, P.P. (2004) Translation and Cancer. *Oncogene*, **23**, 3133-3248.

Perkins, D.J. and Barber, G.N. (2004) Defects in translational regulation mediated by the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 inhibit antiviral activity and facilitate the malignant transformation of human fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **24**, 2025-2040.

Perry, A.K., Chen, G., Zheng, D., Tang, H. and Cheng, G. (2005) The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res*, **15**, 407-422.

Planz, O., Pleschka, S. and Ludwig, S. (2001) MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *J Virol*, **75**, 4871-4877.

Plattner, R., Anderson, M.J., Sato, K.Y., Fasching, C.L., Der, C.J. and Stanbridge, E.J. (1996) Loss of oncogenic ras expression does not correlate with loss of tumorigenicity in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6665-6670.

Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.R. and Ludwig, S. (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol*, **3**, 301-305.

Ries, S. and Korn, W.M. (2002) ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br J Cancer*, **86**, 5-11.

Ries, S.J., Brandts, C.H., Chung, A.S., Biederer, C.H., Hann, B.C., Lipner, E.M., McCormick, F. and Korn, W.M. (2000) Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nat Med*, **6**, 1128-1133.

Rosenwald, I.B. (1996) Upregulated expression of the genes encoding translation initiation factors eIF-4E and eIF-2alpha in transformed cells. *Cancer Lett*, **102**, 113-123.

Rosenwald, I.B., Rhoads, D.B., Callanan, L.D., Isselbacher, K.J. and Schmidt, E.V. (1993) Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6175-6178.

Russell, W.C. (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, **81**, 2573-2604.

Schneider, R.J., Weinberger, C. and Shenk, T. (1984) Adenovirus VAI RNA facilitates the initiation of translation in virus-infected cells. *Cell*, **37**, 291-298.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K. and Nevins, J.R. (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*, **14**, 2501-2514.

Sebolt-Leopold, J.S. and Herrera, R. (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer*, **4**, 937-947.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88**, 593-602.

Shenk, T. (1996) Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Monath, T.P., Melnick, J.L., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, Vol. 1, pp. 2111-2148.

Stofega, M.R., Yu, C.L., Wu, J. and Jove, R. (1997) Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by mitogenic stimuli is repressed in v-Src-transformed cells. *Cell Growth Differ*, **8**, 113-119.

Strong, J.E., Coffey, M.C., Tang, D., Sabinin, P. and Lee, P.W. (1998) The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus. *Embo J*, **17**, 3351-3362.

Sumi, S., Beauchamp, R.D., Townsend, C.M., Jr., Pour, P.M., Ishizuka, J. and Thompson, J.C. (1994) Lovastatin inhibits pancreatic cancer growth regardless of RAS mutation. *Pancreas*, **9**, 657-661.

Taparowsky, E., Shimizu, K., Goldfarb, M. and Wigler, M. (1983) Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell*, **34**, 581-586.

Taylor, S.S., Haste, N.M. and Ghosh, G. (2005) PKR and eIF2alpha: Integration of Kinase Dimerization, Activation, and Substrate Docking. *Cell*, **122**, 823-825.

Thimmappaya, B., Weinberger, C., Schneider, R.J. and Shenk, T. (1982) Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell*, **31**, 543-551.

Unterluggauer, H., Hampel, B., Zwerschke, W. and Jansen-Durr, P. (2003) Senescence-associated cell death of human endothelial cells: the role of oxidative stress. *Exp Gerontol*, **38**, 1149-1160.

Vaillancourt, M.T., Atencio, I., Quijano, E., Howe, J.A. and Ramachandra, M. (2005) Inefficient killing of quiescent human epithelial cells by replicating adenoviruses: potential implications for their use as oncolytic agents. *Cancer Gene Ther*, **12**, 691-698.

Valenzuela, D.M. and Groffen, J. (1986) Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. *Nucleic Acids Res*, **14**, 843-852.

Voorhoeve, P.M. and Agami, R. (2003) The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell*, **4**, 311-319.

Voorhoeve, P.M. and Agami, R. (2004) Unraveling human tumor suppressor pathways: a tale of the INK4A locus. *Cell Cycle*, **3**, 616-620.

Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S. and Sun, P. (2002) Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol*, **22**, 3389-3403.

Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R. and Proud, C.G. (2001) Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo J*, **20**, 4370-4379.

Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G. and Cooper, J.A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J*, **16**, 1909-1920.

Webb, H.E. and Smith, C.E. (1970) Viruses in the treatment of cancer. *Lancet*, **1**, 1206-1208.

Whalen, S.G., Marcellus, R.C., Whalen, A., Ahn, N.G., Ricciardi, R.P. and Branton, P.E. (1997) Phosphorylation within the transactivation domain of adenovirus E1A protein by mitogen-activated protein kinase regulates expression of early region 4. *J Virol*, **71**, 3545-3553.

Williams, B.R. (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, **18**, 6112-6120.

Yang, W.Q., Senger, D., Muzik, H., Shi, Z.Q., Johnson, D., Brasher, P.M., Rewcastle, N.B., Hamilton, M., Rutka, J., Wolff, J., Wetmore, C., Curran, T., Lee, P.W. and Forsyth, P.A. (2003) Reovirus prolongs survival and reduces the frequency of spinal and leptomeningeal metastases from medulloblastoma. *Cancer Res*, **63**, 3162-3172.

Yip-Schneider, M.T., Lin, A., Barnard, D., Sweeney, C.J. and Marshall, M.S. (1999) Lack of elevated MAP kinase (Erk) activity in pancreatic carcinomas despite oncogenic K-ras expression. *Int J Oncol*, **15**, 271-279.

Yip-Schneider, M.T., Lin, A. and Marshall, M.S. (2001) Pancreatic tumor cells with mutant K-ras suppress ERK activity by MEK-dependent induction of MAP kinase phosphatase-2. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 992-997.

# L E B E N S L A U F

## Persönliche Daten

| | |
|---|---|
| Name: | Michael Schümann |
| Geburtsdatum: | 30. April 1976 |
| Geburtsort: | Düsseldorf |
| Adresse: | Zum Stempel 9, 35043 Marburg |
| Familienstand: | verheiratet, 2 Kinder |

## Schulischer Werdegang

| | |
|---|---|
| 31.08.1982 - 23.07.1986 | Matthias-Claudius-Grundschule, Düsseldorf |
| 08.09.1986 - Juni 1995 | Städt. Humboldt-Gymnasium, Düsseldorf<br>Abschluss: Allg. Hochschulreife (Note 1,5) |

## Zivildienst

| | |
|---|---|
| 04.09.1995 - 30.09.1996 | Schutzstation Wattenmeer e. V., Hallig Hooge |

## Wissenschaftliche Ausbildung

| | |
|---|---|
| WS 1996/97 - SS 1998 | Studium der Biologie<br>Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf<br>Abschluss: Vor-Diplom (Note: 1,3) |
| Seit WS 1998/99 | Philipps-Universität, Marburg |
| September 2000 | Diplomprüfung (Mikrobiologie, Genetik, Virologie) |
| Oktober 2000 - Dezember 2000 | Auslandstrimester University of Oxford |
| Januar 2001 - Oktober 2001 | Diplomarbeit am Instititut für Virologie<br>(Diplom-Gesamtnote: 1,1) |
| November 2001-November 2005 | Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Virologie |

## Publikationen


Khati M, Schuman M, Ibrahim J, Sattentau Q, Gordon S, James W. (2003) Neutralization of infectivity of diverse R clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'F-RNA aptamers. *Journal of Virology,* 77(23), 12692-8.

Schümann M and Dobbelstein M. (2006) Adenovirus-induced ERK phosphorylation during the late phase of infection enhances viral potein levels and virus progeny. *Cancer Research*, 66(3), in press.

Schümann M and Dobbelstein M. (2006) Activating Ras mutations fail to ensure efficient replication of adenovirus mutants lacking VA-RNA. *Cell Cycle*, 5(3), 315-321.


Marburg, Februar 2006 _____

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk für die fortwährende Unterstützung und die Möglichkeit, am Institut für Virologie in Marburg meine Doktorarbeit angefertigt haben zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Dobbelstein für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Seine erfahrene Anleitung in Theorie und Praxis hat grundlegend zum Erfolg meiner Dissertation beigetragen. Er unterstützte stets die selbständige Bearbeitung der Forschungsprojekte, war immer offen für Anregungen und ein wichtiger Gesprächspartner in zahlreichen Diskussionen.

Sämtlichen Kollegen der Arbeitsgruppe Dobbelstein danke ich für die fachliche Unterstützung und jederzeit erwiesene Hilfsbereitschaft. Ganz besonders danke ich dabei Constanze Möritz und Isa Drewelus, die wesentlich zur erfolgreichen Fortsetzung der Laborarbeit in Marburg nach dem Umzug der Arbeitsgruppe nach Odense und Göttingen beigetragen haben und stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Markus Kleinschmidt, Peggy Möller und Merle Windgassen danke ich für die vielen, hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Desweiteren haben die folgenden Personen meine Doktorarbeit unterstützt:

- Herr Prof. Dr. E. J. Stanbridge schickte uns die isogenischen Zellen HT-1080 6TG und MCH603c8.
- Herr Prof. Dr. R. Agami und Dr. Stefan Gaubatz stellten die BJ-ET Zellen zur Verfügung.
- PD Dr. Sabine Müller-Brüsselbach und Tanja Bilz halfen mit verschiedenen Zelllinien aus.
- Dr. Hermann Gram schickte uns den MNK1-Inhibitor CGP37580.

Abschließend gilt mein persönlicher Dank meiner Familie in Marburg und Düsseldorf.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Onkogene Signalwege bei der Infektion mit Adenoviren**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, 20. November 2005 _____