

Aus dem  
CharitéCentrum 5 für präventive und diagnostische Labormedizin  
Institut für Virologie  
Direktorin: Prof. Dr. Regine Heilbronn

## **Habilitationsschrift**

# **Identifizierung und Charakterisierung von zellulären Zielstrukturen der regulatorischen (Rep) Proteine des Adeno-assoziierten Virus (AAV)**

Zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Virologie  
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. rer. nat. Stefan Weger**  
**geboren am 09.02.1960 in Wolfenbüttel/Niedersachsen**

Eingereicht am: 07.12.2007

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Roggendorf, Essen

2. Gutachter: Prof. H.-G. Kräusslich, Heidelberg

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1	Adeno-assoziierte Viren	
1.1.1	Klassifikation und Lebenszyklus der Adeno-assoziierten Viren....	5
1.1.2	Die Struktur der Adeno-assoziierten Viren.....	6
1.1.3	Das Genom der Adeno-assoziierten Viren.....	6
1.2	Die Regulation des AAV Lebenszyklus	
1.2.1	Produktive und latente Infektion.....	8
1.2.2	Helferfunktionen.....	9
1.2.3	Die Regulation der AAV Transkription.....	11
1.2.4	Die AAV DNA Replikation.....	12
1.2.5	Enkapsidierung der AAV-DNA.....	15
1.3	AAV/Rep vermittelte Hemmeffekte.....	16
1.3.1	AAV/Rep vermittelte Hemmung der Zellproliferation und des Zellzyklus.....	16
1.3.2	AAV/Rep vermittelte Hemmung viraler Replikation, zellulärer DNA Replikation und heterologer Genexpression.....	17
1.3.3	AAV/Rep vermittelte Hemmung der Zelltransformation.....	19
1.4	Die AAV Rep Proteine	
1.4.1	Funktionelle Eigenschaften und Domänen der Rep Proteine.....	20
1.4.2	Wechselwirkung der AAV Rep Proteine mit zellulären Proteinen...	22
1.4.3	Posttranslationale Modifikationen der AAV Rep Proteine.....	22
1.5	Fragestellung und Zielsetzung.....	23

## 2 Ergebnisse und Diskussion

2.1	Mutationsanalyse der AAV-2 Rep vermittelten Hemmung heterologer und homologer Promotoren	
2.1.1	Einführung.....	24
2.1.2	Originalarbeit.....	25

2.1.3	Abschließende Diskussion.....	37
2.2	Analyse der Regulation der AAV-2 Genexpression in Gegenwart von Adenovirus: Die Rolle der AAV-2 Rep Proteine, der AAV-ITRs und der Funktionen des Helfervirus	
2.2.1	Einführung.....	40
2.2.2	Originalarbeit.....	41
2.2.3	Abschließende Diskussion.....	52
2.3	Identifizierung und Charakterisierung von zellulären Interaktionspartnern der regulatorischen (Rep) Proteine von AAV-2	
2.3.1	Einführung.....	55
2.3.2	Interaktion der großen AAV-2 Rep Proteine Rep78 und Rep68 mit dem transkriptionellen Koaktivator PC4	
2.3.2.1	Einführung.....	56
2.3.2.2	Originalarbeit.....	58
2.3.2.3	Abschließende Diskussion und weiterführende Ergebnisse.....	68
2.3.3	Regulation der Stabilität der großen AAV-2 Rep Proteine Rep78 und Rep68 durch Modifikation mit dem „Small Ubiquitin like Modifier“ (SUMO-1)	
2.3.3.1	Einführung.....	71
2.3.3.2	Originalarbeit.....	73
2.3.3.3	Abschließende Diskussion.....	84
2.3.4	Interaktion der großen AAV-2 Rep Proteine Rep78 und Rep68 mit dem p53 und Topoisomerase I bindenden Protein Topors	
2.3.4.1	Einführung.....	85
2.3.4.2	Originalarbeit.....	86
2.3.4.3	Abschließende Diskussion.....	92
2.3.5	Modifikation von Topors mit dem Ubiquitin-ähnlichen Polypeptid SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier)	
2.3.5.1	Einführung.....	92
2.3.5.2	Originalarbeit.....	94
2.3.5.3	Abschließende Diskussion.....	109

2.3.6 Funktionelle Charakterisierung von Topors als SUMO-1 Ligase für das Tumorsuppressorprotein p53	
2.3.6.1 Einführung.....	111
2.3.6.2 Originalarbeit.....	113
2.3.6.3 Abschließende Diskussion und weiterführende Ergebnisse.....	119
2.3.7 Poly-SUMOlierung der DNA Topoisomerase I durch Topors	
2.3.7.1 Einführung.....	122
2.3.7.2 Originalarbeit.....	125
2.3.7.3 Abschließende Diskussion.....	132
2.3.8 Funktionelle Interaktion der großen Rep Proteine mit dem zytoplasmatischen Protein KCTD5	
2.3.8.1 Einführung.....	136
2.3.8.2 Originalarbeit.....	137
2.3.8.3 Abschließende Diskussion.....	152
<b>3 Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>154</b>
<b>4 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>157</b>
<b>5 Literatur.....</b>	<b>159</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Adeno-assoziierte Viren

### 1.1.1 Klassifikation und Lebenszyklus der Adeno-assoziierten Viren

Die Adeno-assoziierten Viren (AAV) gehören zur Familie der Parvoviridae, den kleinsten bekannten tierischen Viren. Alle Parvoviren besitzen ein lineares, einzelsträngiges DNA-Genom in einem nicht umhüllten, ikosaedrischen Kapsid von 18 bis 26 nm Durchmesser. Sie gliedern sich in die zwei Unterfamilien der Densovirinae, die Insekten infizieren und die der Parvovirinae, deren Wirte Vertebraten sind. Die Unterfamilie der Parvovirinae umfasst fünf Genera: Die Parvoviren, die Erytroviren, die Betaparvoviren, die Amdoviren und die Dependoviren. Die Vertreter des Genus Parvovirus können sich in proliferierenden Zellen autonom replizieren. Dies gilt auch für die Erythroviolen, die auf Grund ihres ausgeprägten Tropismus für Vorläuferzellen von Erythrozyten in einem separaten Genus zusammengefasst werden. Zu diesen gehört B19, der Erreger der Ringelröteln und damit das einzige derzeit bekannte humanpathogene Parvovirus.

Die Dependoviren oder auch Adeno-assoziierten Viren (AAV) sind für eine produktive Vermehrung in Kulturzellen, außer unter speziellen Bedingungen, auf die Koinfektion mit einem Helfervirus (Adeno-, Herpes- oder Vacciniaviren) angewiesen (4, 27). In Abwesenheit eines Helfervirus kann AAV in Kulturzellen eine latente Infektion unter Integration des viralen Genoms in das zelluläre Genom etablieren (44, 146). Dabei wird die DNA des Subtyps AAV-2 bei circa 70% der Integrationsereignisse ortsspezifisch in einen eng begrenzten Bereich auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 19, die so genannte AAV-S1 Region, integriert (148, 149). Ein Nachweis der ortsspezifischen Integration in menschlichen Geweben ist bisher noch nicht gelungen. Ebenso ist der Latenzort der humanen AAVs im menschlichen Organismus bisher unbekannt, obwohl beispielsweise der Serotyp AAV-5 ursprünglich aus einer Genitalwarze isoliert wurde (10). In einer neueren Untersuchung mit menschlichen Gewebeproben aus Mandeln, Milz, Lunge, Muskel, Leber und Herz konnte AAV DNA, und zwar bevorzugt die des Serotyps 2, fast ausschließlich in Drüsengewebe aus Mandeln nachgewiesen werden (43). In neun im Detail charakterisierten Proben lag die AAV DNA dabei nur in einer einzigen in integrierter Form in einer Satelliten-Region des Chromosoms 1, in den übrigen dagegen extrachromosomal als zirkuläres, doppelsträngiges Episom vor (263). Die Serotypen AAV-2 und AAV-3, die für Menschen endemisch sind, sowie die Serotypen AAV-1 und AAV-4, die bevorzugt nichtmenschliche Primaten infizieren, wurden ursprünglich als Kontaminationen von Adenovirus-Präparationen isoliert. Während es sich bei dem Serotyp AAV-6 wahrscheinlich um eine Rekombinante zwischen AAV-1 und AAV-2 handelt (322), wurden zwei weitere Serotypen, AAV-7 und AAV-8, mittels PCR-Amplifikation aus Herzgewebe von Rhesusaffen, welche mit

adenoviralen Vektoren behandelt worden waren, isoliert (77). Eine Reihe von weiteren AAV Serotypen wurden in jüngster Zeit aus verschiedenen Spezies isoliert (170, 262).

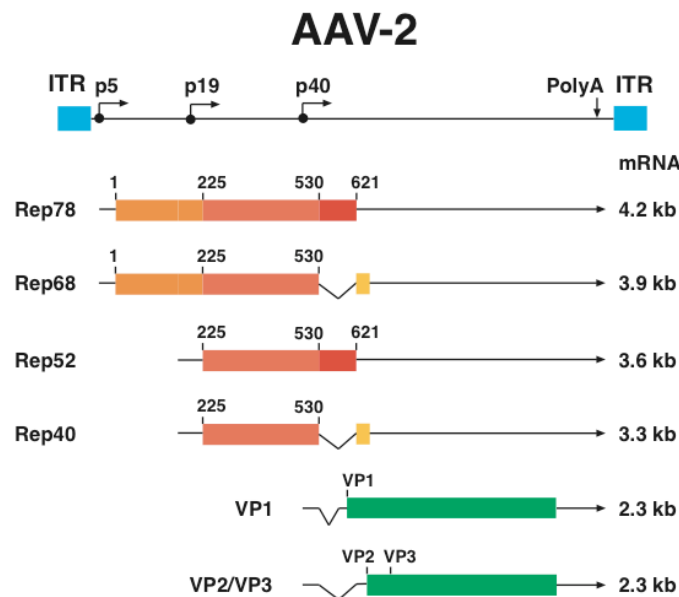
### **1.1.2. Die Struktur der Adeno-assoziierten Viren**

Das Kapsid des am besten untersuchten AAV Subtyps, AAV-2, besteht ausschließlich aus den drei Kapsidproteinen VP1, VP2 und VP3 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 : 10. Die Struktur von AAV-2 wurde mittels Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 3 Angström bestimmt (323). Das Kapsid enthält 60 Untereinheiten mit einer ikosaedrischen Symmetrie ( $T = 1$ ). Das grundlegende Strukturmotiv der AAV-2 Untereinheiten gründet sich wie bei den autonomen Parvoviren auf einem so genannten  $\beta$ -Zylinder, der aus 2 antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen mit jeweils 4 Strängen besteht. Die langen Schleifen zwischen den einzelnen Strängen der  $\beta$ -Faltblattstruktur, welche ca. 60% des AAV-2 Kapsids ausmachen, bilden wichtige Oberflächenstrukturen des Virions und sind für die Bindung an zelluläre Rezeptoren und die Bindung neutralisierender Antikörper verantwortlich. Der zelluläre Rezeptor für AAV-2 ist Heparansulfat-Proteoglykan (279), während als Korezeptoren in verschiedenen Zelltypen sowohl  $\alpha$ V- $\beta$ 5 Integrine (278) als auch FGFR, der Rezeptor für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (232), identifiziert wurden. Dagegen scheinen die Subtypen AAV-4 und AAV-5 über Sialinsäure-haltige Primärrezeptoren an die Zelloberfläche zu adsorbieren (132).

### **1.1.3 Das Genom der Adeno-assoziierten Viren**

Das Genom der Parvoviren liegt in Form einer linearen, einzelsträngigen DNA, typischerweise mit einer Größe von 5 kb, vor. Die genetische Karte von AAV (Abb. 1) wurde hauptsächlich aus Untersuchungen am Subtyp AAV-2, der eine Länge von 4679 Basen hat (274), abgeleitet. Die Genomorganisation ist aber auf der Grundlage von vergleichenden Sequenzdaten hoch konserviert zwischen den verschiedenen Subtypen. Während die autonomen Parvoviren in der Regel nur DNA-Stränge einer Polarität in ihre Kapside einbauen (den zur mRNA komplementären- oder auch Minusstrang), enkapsidieren die Adeno-assoziierten Viren Stränge beider Polarität in gleichem Ausmaß (246). Alle Parvoviren besitzen an den Enden palindromische Sequenzen. Diese sind bei den autonomen Parvoviren in der Regel nicht identisch, bei den Adeno-assoziierten Viren hingegen liegen sie als invertierte terminale Wiederholungen (ITRs) vor. Die ITRs umfassen bei AAV-2 145 Basenpaare, von denen die ersten 125 palindromisch sind und durch Basenpaarung eine T-förmige Struktur ausbilden können. Dabei werden 2 interne Palindrome von einem weiteren, etwas größeren Palindrom flankiert. Die beiden Enden von AAV-2 können in 2 Orientierungen (als Flip und Flop bezeichnet) vorliegen, die durch die Inversion von ITR-Sequenzen während der AAV DNA Replikation entstehen. Die ITRs sind als cis aktive Sequenzen erforderlich für die AAV DNA Replikation (266), für die Regulation der AAV

Genexpression (16, 158) und für die Enkapsidierung des AAV-Genoms (184). Darüber hinaus sind sie essentiell für die Integration des AAV-Genoms während der latenten Infektion (44, 160, 328) und für die Freisetzung des AAV-Genoms aus dem integrierten Zustand nach Infektion mit einem Helfervirus (254).



*Abbildung 1: Das AAV-2 Genom mit den endständigen Invertierten Terminalen Wiederholungen (ITRs), den regulatorischen (Rep) Proteinen und den Struktur (VP) Proteinen. Modifiziert nach (202).*

Neben den ITRs als cis aktive Sequenzen enthält das AAV-Genom zwei offene Leserahmen. Der Leserahmen in der linken Hälfte des Genoms, der sich auf der genetischen Karte von Position 5 bis Position 40 erstreckt, kodiert für eine Familie multifunktioneller, regulatorischer Nichtstruktur-Proteine. Diese werden als Rep Proteine bezeichnet, da größere Deletionen innerhalb dieses Leserahmens oder Punktmutationen, die in einer Verschiebung des Leserasters resultieren, zu einem Block in der AAV DNA Replikation führen (102, 286). Vom p5 Promotor werden eine nicht gespleißte und eine einfach gespleißte mRNA von 4,2 bzw. 3,9 kb Länge transkribiert, die für die großen Rep Proteine Rep78 bzw. Rep68 kodieren. Die korrespondierenden kleinen Rep Proteine Rep52 und Rep40, welche als N-terminal verkürzte Rep78 und Rep68 Proteine aufgefasst werden können, werden durch eine nicht gespleißte 3,6 kb und eine einfach gespleißte 3,3 kb mRNA kodiert, die vom p19 Promotor ausgehen. Die Spleiß-Donor und die Spleiß-Akzeptorstelle liegen an den AAV-2 Nukleotid-Positionen 1907 und 2228 (163, 174, 177). Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 sind 621, 536, 397 und 312 Aminosäuren lang (188).

Der offene Leserahmen in der rechten Hälfte des AAV-Genoms kodiert für die drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3. Diese werden von zwei alternativ gespleißten 2,3 kb langen mRNAs translatiert, die ausgehend vom p40 Promotor transkribiert werden. Dabei kodiert die hauptsächlich gebildete mRNA für die Kapsidproteine VP2 und VP3. Während

VP3 an einem gewöhnlichen AUG Startkodon initiiert wird, wird für die Synthese von VP2 ein stromaufwärts gelegenes ACG Startkodon verwendet, was zu einer circa 10-fach geringeren Translation von VP2 im Vergleich zu VP3 führt (17, 198). Die Spleiß-Donor und Akzeptorstelle dieses Transkriptes entsprechen denen der Transkripte für die Rep68 und Rep40 Proteine. VP1 wird translatiert von einem zweiten, in geringeren Mengen gebildeten p40 Transkript, welches unter Verwendung einer alternativen Akzeptorstelle an AAV-2 Nukleotidposition 2201 gepleißt wird und im Vergleich zum hauptsächlichen Transkript ein zusätzliches, stromaufwärts gelegenes AUG Startkodon für VP1 enthält (17, 198, 288). Durch das relative Verhältnis der beiden Transkripte und die unterschiedliche Translationseffizienz von VP2 und VP3 ergibt sich das auch im fertig assemblierten Kapsid vorliegende stöchiometrische Verhältnis der drei Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 von 1 : 1 : 10.

## 1.2 Die Regulation des AAV Lebenszyklus

### 1.2.1 Produktive und latente Infektion

Eine der Besonderheiten der produktiven Vermehrung von AAV in Zellkultur ist seine Abhängigkeit von einer Koinfektion mit einem Helfervirus (Abb. 2). Eine komplette Helferfunktion mit Bildung von infektiösem AAV konnte für Adenovirus (4), für die Herpes Simplex Viren (HSV) Typ 1 und 2 (27) sowie mit vergleichsweise stark verminderter Effizienz für das humane Cytomegalievirus (185) und das Humane Papillomavirus vom Typ 16 (213, 295) nachgewiesen werden. Zumindest einen partiellen Helfereffekt, der zur AAV DNA Replikation und zur Synthese von Kapsidproteinen führt, scheinen das Varizella Zoster Virus (81) und das Vaccinia-Virus (259) zu vermitteln, die Bildung von infektiösen AAVs konnte jedoch für diese Helferviren bislang nicht nachgewiesen werden.

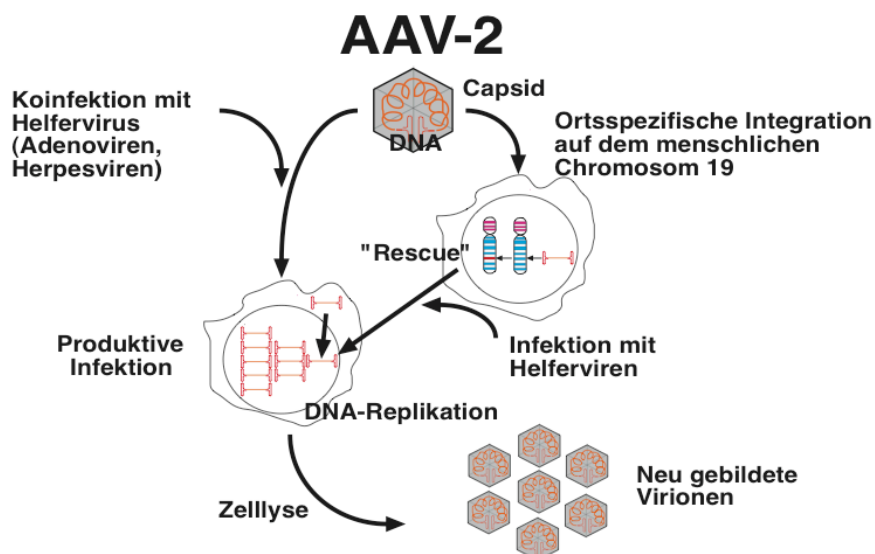


Abbildung 2: Der AAV Lebenszyklus



In Abwesenheit von Helfervirus kann AAV in Zellkultur eine latente Infektion etablieren, die in vielen Fällen in die ortsspezifische Integration der AAV-DNA in eine circa 4 kb große Region auf dem langen Arm des menschlichen Chromosoms 19, die so genannte AAV-S1 Region, mündet (147, 148, 255). Überinfektion der latent infizierten Zellen mit einem Helfervirus führt zur Replikation der integrierten AAV-DNA und zur Einleitung eines produktiven Vermehrungszyklus (44, 160). Dabei ist noch nicht geklärt, ob die integrierte AAV-DNA tatsächlich wieder aus dem Wirtsgenom herausgeschnitten wird oder ob sie nur als Matrize für die Synthese neuer Virus-DNA dient. Die ortsspezifische Integration der AAV-DNA auf dem menschlichen Chromosom 19 wird als Überlebensstrategie des Virus in Abwesenheit von Helfervirus angesehen. Weitgehend unklar ist das Zielgewebe des AAV während der natürlichen Infektion. *In vivo* wurde AAV fast ausschließlich als Kontamination von Adenovirus-Isolaten gefunden (21). Obwohl dieser Befund wie für Adenoviren eine Infektion über die Atemwege oder den Gastrointestinaltrakt nahe legt, konnte AAV in Lungengewebe bisher nicht detektiert werden. Dagegen konnte AAV außer aus Drüsengewebe der Mandeln auch aus dem Genitaltrakt HSV infizierter Frauen und aus hämatopoetischen Zellen isoliert werden (75, 86). Die *in vitro* Integrationsstelle von AAV auf dem menschlichen Chromosom 19, AAVS1, befindet sich in Nachbarschaft zum Skelettmuskel-spezifischen Troponin T1 Gen (TNNT1) und die Integration von AAV *in vitro* kann zur Bildung von AAV1-TNNT1 Verbindungssequenzen führen (68). Zusammen mit der Beobachtung, dass rekombinante AAV Partikel in Nagern bevorzugt die langsame Skelettmuskulatur transduzieren, hat dies zu der Hypothese geführt, dass die menschliche Skelettmuskulatur möglicherweise den natürlichen Integrationsort für AAV darstellt. Die Skelettmuskulatur als mögliches Reservoir für integriertes AAV ist weitgehend resistent gegenüber Adenovirus- und Herpesvirus-Infektionen, so dass Infektionen mit diesen Helferviren keinen produktiven AAV Zyklus induzieren könnten. Diese Hypothese konnte jedoch bisher durch experimentelle Daten nicht weiter erhärtet werden.

### **1.2.2 Helferfunktionen**

Eine umfassende genetische Analyse der für eine produktive AAV Vermehrung benötigten Funktionen des Helfervirus wurde für Adenovirus durchgeführt. Vier adenovirale Proteine sind für einen kompletten Helfereffekt erforderlich: der E1A Transaktivator, das E1B 55 kDa Protein, das E2A Einzelstrang-DNA-bindende Protein, und das Produkt des offenen Leserahmens 6 (ORF6) der E4 Region. Zusätzlich ist noch die Synthese der Virus-assoziierten RNA (VA-RNA) erforderlich. Späte Funktionen von Adenovirus werden hingegen nicht benötigt. Der E1A Transaktivator induziert sowohl die Transkription der anderen frühen Funktionen von Adenovirus (201) als auch die Transkription der AAV-Gene (39). Zusätzlich bewirkt E1A im Zusammenspiel mit anderen adenoviralen Proteinen einen Eintritt der Zellen in die S-Phase. Dies führt zur verstärkten Synthese von zellulären

Replikationsproteinen, die für die AAV-Replikation erforderlich sind (201). Das E2A Einzelstrang-DNA-bindende Protein scheint nicht für die AAV DNA Replikation benötigt zu werden (29), sondern aktiviert die AAV Transkription und stimuliert möglicherweise den Transport der AAV mRNAs bzw. führt zu deren Stabilisierung (29, 38). In zellfreien Replikationssystemen mit Extrakten aus Adenovirus infizierten Zellen kann jedoch präferentiell E2A an Stelle des zellulären Einzelstrang-DNA bindenden Protein RPA (replication protein A) die AAV DNA Replikation unterstützen (305). Das E4 ORF6 34 kDa Protein stimuliert zum einen nach Komplexbildung mit dem E1B 55 kDa Protein den Transport der AAV mRNAs in das Zytoplasma (253), zum anderen wurde für rekombinante AAV Partikel gezeigt, dass es durch Induktion der Zweitstrangsynthese die verstärkte Konversion der aus dem Viruspartikel freigesetzten Einzelstrang-DNA zu einer transkriptionskompetenten Doppelstrang-Form vermittelt (70, 72). Die adenovirale VAI-RNA schließlich erleichtert die Translation der AAV-Proteine durch Aufhebung der Interferon-induzierten Blockierung der Translationsinitiation (122).

Die für eine produktive AAV-Replikation benötigten Helferfunktionen des Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) wurden in zwei Untersuchungen charakterisiert. In der ersten Untersuchung wurden das ICP4 Transaktivator-Protein, das Einzelstrang-DNA bindende Protein ICP8 (kodiert durch das UL29 Gen), das an den HSV Replikationsursprung bindende Protein (UL9), die HSV DNA Polymerase (UL30) und zwei Komponenten des Helicase/Primase-Komplexes (UL5, UL8) als Helferfunktionen identifiziert (190). Die zweite Untersuchung dagegen charakterisierte das Einzelstrang-DNA bindende Protein ICP8 und alle drei Komponenten des Helicase/Primase-Komplexes (UL5, UL8 und UL52) als essentiell für die AAV Replikation (308). Im Gegensatz zu obigen Experimenten wurden dabei die HSV Gene von einem heterologen Promotor exprimiert, was die unterschiedlichen Befunde bezüglich ICP4 erklären könnte. ICP4 wird als Transaktivator für die Expression der übrigen HSV Gene benötigt.

Es ist nicht geklärt, warum mit Adenovirus als Helfer für die AAV-Replikation die adenoviralen Replikationsproteine für den Helfereffekt nicht benötigt werden, während für HSV fast ausschließlich virale Replikationsfaktoren am Helfereffekt beteiligt sind. Im Fall von Adenovirus besteht möglicherweise ein großer Teil des Helfereffektes darin, das geeignete zelluläre Milieu für eine produktive AAV Replikation zu induzieren. Dies könnte durch Induktion der Synthese bzw. der lokalen Anreicherung von für die AAV DNA Replikation erforderlichen zellulären Faktoren wie beispielsweise DNA Polymerasen erfolgen. Diese Hypothese wird gestützt durch Befunde, dass verschiedene Säuger-Zelllinien semipermissiv für eine produktive AAV Replikation werden, wenn sie mit genotoxischen Agenzien wie UV-Bestrahlung, Hydroxy-Harnstoff, Cycloheximid, Aphidicolin, Topoisomerase-Inhibitoren oder chemischen Karzinogenen behandelt werden (316, 325-327). Einige diese Agenzien arretieren den Zellzyklus in der G1/S-Phase, was möglicherweise zu einer Akkumulation von zellulären Replikationsfaktoren führt. Nach einer Koinfektion mit AAV und Adenovirus kommt es zu einer Relokalisation der AAV-DNA und der AAV Rep

Proteine in die adenoviralen Replikationszentren (309), in denen zelluläre Replikationsfaktoren akkumulieren. Auch nach Koinfektion mit HSV findet man die AAV Rep Proteine, in Abhängigkeit von den AAV-ITRs und vermittelt durch das Einzelstrang-DNA bindende Protein ICP8 von HSV, in den viralen Replikationszentren des Helfervirus (94).

### **1.2.3 Die Regulation der AAV Transkription**

Im Verlauf einer produktiven AAV-2 Infektion werden sieben polyadenylierte AAV messenger-RNAs gebildet (163), deren Synthese von drei RNA Polymerase II Promotoren an den AAV-Genom Positionen 5, 19 und 40 reguliert werden und die ein gemeinsames Polyadenylierungssignal an AAV-Position 96 besitzen. Die für Rep78 und Rep68 kodierenden 4.2 und 3.9 kb Transkripte werden am p5 Promotor, die für Rep52 und Rep40 kodierenden 3.6 und 3.3 kb Transkripte am p19 Promotor, und das 2.6 kb und die beiden für die Kapsidproteine kodierenden 2.3 kb Transkripte am p40 Promotor initiiert (Abb. 1, das ungespleißte 2.6 kb Transkript ist nicht dargestellt). Die gemeinsam von einem Promotor abgelesenen Transkripte unterscheiden sich durch das Fehlen eines Introns von AAV Position 42 bis 46 bei den jeweils kleineren Transkripten, wobei die beiden 2.3 kb Transkripte durch zwei unterschiedliche, eng benachbarte Spleiß-Akzeptorstellen generiert werden (198). Über die Funktion des ungespleißten 2.6 kb Transkriptes ist nichts bekannt. Es könnte theoretisch für ein kleines Protein von 8 kDa mit einem innerhalb des Introns gelegenen Leserahmen, das so genannte Intron-Protein kodieren. Dieses hypothetische Protein konnte aber bislang nicht nachgewiesen werden. Während bei den p5 und p19 Transkripten die ungespleißten Transkripte wesentlich häufiger sind als die gespleißten, verhält es sich bei den p40 Transkripten umgekehrt. Im Verlauf der produktiven Infektion lassen sich zuerst das ungespleißte p5 Transkript und das von ihm kodierte Rep78 Protein nachweisen, kurz darauf dann das ungespleißte p19 Transkript und das Rep52 Protein (241). Mit einiger Verzögerung werden dann die gespleißten p5, p19 und p40 Transkripte und die von ihnen kodierten Proteine Rep68, Rep40 und VP1 bis VP3 gebildet. Die Veränderungen in den Verhältnissen von gespleißten zu ungespleißten Transkripten werden durch Funktionen des Helfervirus und durch das Rep78 Protein reguliert (195, 234). In den drei AAV Promotoren wurden eine ganze Reihe von cis-regulatorischen Elementen identifiziert. Der p5 Promotor enthält eine Bindungsstelle für MLTF (major late transcription factor) und zwei YY1 Bindungsstellen, von denen eine stromaufwärts der p5 TATA-Box liegt und die andere mit dem Transkriptionsstart überlappt. Zwischen der TATA-Box und der stromaufwärts gelegenen YY1 Bindungsstelle befindet sich eine Bindungsstelle für die großen Rep Proteine Rep78 und Rep68 (RBE) (182). Zusammen mit jeweils zwei Rep-Bindungsstellen in den AAV ITRs sind diese Elemente wesentlich an der Regulation der p5 Transkription beteiligt. Der p19 Promotor enthält neben einer TATA-BOX zwei GC-reiche Sp1 Bindungsstellen, eine GGT-Box, die ebenfalls als Sp1 Bindungssequenz fungieren kann, und ein CArG-Element, welches einen

bisher noch nicht identifizierten zellulären Faktor mit einem Molekulargewicht von 34 kDa bindet, der als cAAP (cellular AAV activating protein) bezeichnet wird (222). Für die Aktivität des p40 Promotors schließlich sind eine TATA-Box und eine Sp1-Bindungsstelle essentiell, mit einer möglichen zusätzlichen Beteiligung von ATF und AP1 Bindungsstellen (221).

Die Regulation der drei AAV Promotoren wird ganz entscheidend durch die Anwesenheit eines Helfervirus beeinflusst. In Abwesenheit von Helfervirus kommt es zu einer schwachen basalen Expression des p5 und des p19 Promotors (16, 180), die zu einer im Western Blot detektierbaren Synthese von Rep78 und Rep52 führt (S.Moser und R.Heilbronn, unveröffentlichte Daten). Die weitere Transkription von den p5 und p19 Promotoren wird dann durch Rep78 und eventuell auch Rep52 inhibiert (16, 155, 220). Die Mutation des Rep-Bindungselements (RBE) im p5 Promotor resultiert in einer erhöhten p5 Transkriptionsrate und die entsprechende Virusmutante kann in 293 Zellen in einem geringen Umfang autonom replizieren (303). 293 Zellen exprimieren konstitutiv die Adenovirus E1A und E1B Gene (84), die zu einer weiteren Steigerung der p5 Transkription führen.

Die Koinfektion mit Adenovirus führt über eine Kaskade hintereinander geschalteter Regulationsmechanismen zu einer Aktivierung der Expression aller AAV Genprodukte. Ein erster Schritt ist die Aktivierung des p5 Promotors durch das adenovirale E1A Genprodukt, die durch die Wechselwirkung von E1A mit YY1, welches sowohl als Repressor als auch als Aktivator fungieren kann, induziert wird (269). Die p5 Genprodukte Rep78/Rep68 fungieren nun im Gegensatz zur Situation in Abwesenheit von Helfervirus ebenfalls als Transaktivatoren und führen zu einer erhöhten Transkription der p19 und p40 Promotoren (158, 221, 222). Die Transaktivierung des p19 Promotors ist abhängig von den RBEs in den ITRs und im p5 Promotor sowie von der stromabwärts gelegenen Sp1-Bindungsstelle und dem CARG-Element im p19 Promotor (222). Für die Transaktivierung des p40 Promotors sind die identischen Elemente wie für die Transaktivierung des p19 Promotors und zusätzlich die Sp1-Bindungsstelle im p40 Promotor erforderlich (221). Zusätzlich zur differentiellen Regulation der AAV Genexpression durch Adenovirus und die AAV Rep Proteine auf der Ebene der Transkription scheinen noch posttranskriptionelle Mechanismen der Regulation zu existieren. Das adenovirale E1B 55 kDa Protein stimuliert zusammen mit dem E4 ORF6 34 kDa Protein den Transport der AAV mRNAs in das Zytoplasma (253). Eine Überexpression von Rep78 und Rep68 inhibiert posttranskriptionell die Kapsidproteinsynthese, möglicherweise auf der Ebene der Translation (289).

#### **1.2.4 Die AAV DNA Replikation**

Das derzeit gültige Modell der AAV-DNA Replikation geht von einer Verdrängung des parentalen Einzelstranges im Verlauf der DNA-Neusynthese aus (Abb. 3) (90, 275).

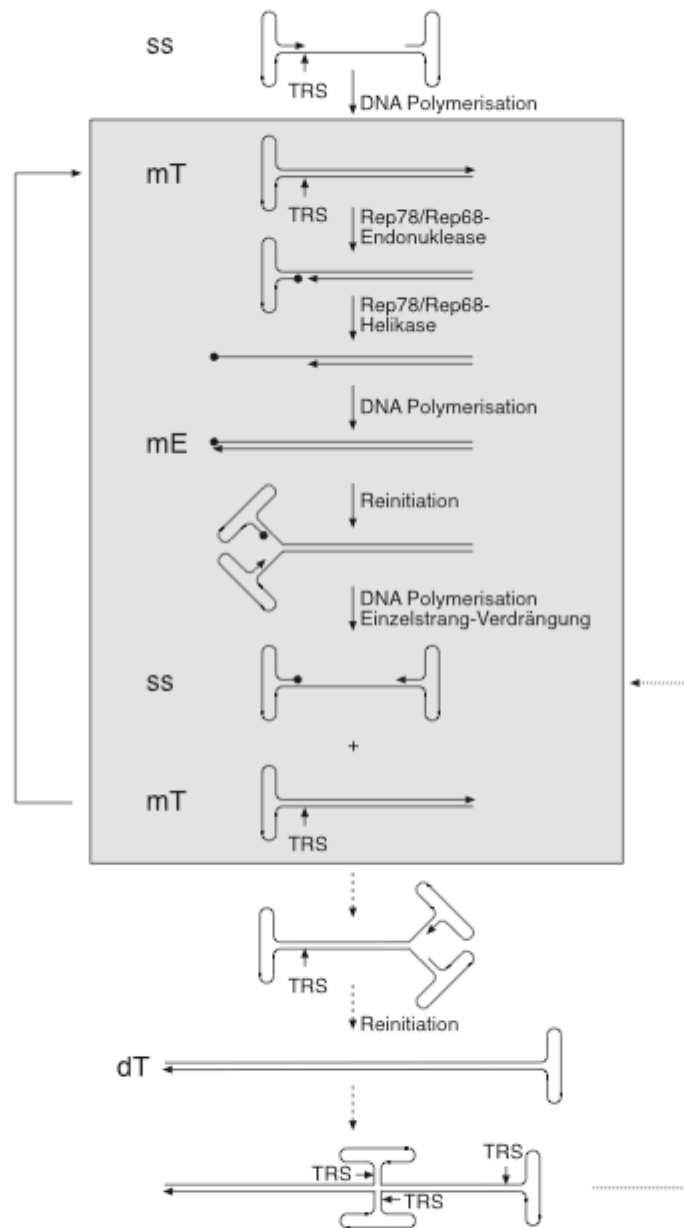


Abbildung 3: Modell der AAV DNA Replikation. Modifiziert nach (202).

Als AAV Elemente sind die ITRs in *cis* und die Rep Proteine in *trans* erforderlich. Im Gegensatz zur zellulären DNA-Synthese werden für die Replikation des Virusgenoms keine RNA Primer oder andere Okazaki-Fragment ähnliche Nukleinsäuren benötigt. Die Funktion eines Primers mit einer freien 3'-OH Gruppe übernimmt die ITR-Region am 3'-Ende des AAV-Genoms, die durch Bildung einer Haarnadel-Struktur die DNA-Synthese des komplementären DNA-Stranges initiieren kann (173). An der Polymerisationsreaktion sind das zelluläre Einzelstrang-DNA bindende Protein (RPA), PCNA (proliferating cell nuclear antigen), RFC (replication factor C) und höchstwahrscheinlich die zellulären DNA

Polymerasen  $\delta$  und/oder  $\epsilon$  beteiligt (209). Als Zwischenprodukt entsteht zunächst ein doppelsträngiges, am ursprünglichen 3'-Ende in der Haarnadel-Konfiguration kovalent geschlossenes DNA-Molekül. Eine mit Rep78 und Rep68 assoziierte Endonuklease-Aktivität setzt nun einen Strang-spezifischen Einzelstrangsschnitt nahe dem Ende der geschlossenen Palindrom-Struktur (AAV-2 Nukleotid-Position 124) und generiert so ein freies 3'-OH-Ende. Von diesem wird nun die Neusynthese der zweiten Haarnadelstruktur, bei gleichzeitiger Verdrängung des ursprünglichen Stranges, initiiert. Der Einzelstrang-Schnitt wird als „terminal resolution“ und die Sequenz- und Strang-spezifische Schnittstelle auf den AAV-ITRs als „terminal resolution site“ (TRS) bezeichnet. Es entsteht ein lineares Doppelstrang-Molekül mit jeweils zwei vollständigen ITRs auf den beiden Einzelsträngen. Dieses Doppelstrang-Molekül liegt in der offenen, d.h nicht kovalent geschlossenen Form vor, so dass jedes der beiden Enden nach Denaturierung eine doppelte Haarnadel-Struktur mit jeweils einem freien 3'-OH-Ende als Primer ausbilden kann. Durch eine von einem der beiden 3'-OH-Enden ausgehende Polymerisationsreaktion wird nun zum einen ein vollständiger DNA-Einzelstrang aus diesem Intermediat verdrängt, zum anderen bildet sich erneut ein doppelsträngiges, an einem Ende kovalent geschlossenes DNA-Molekül. Während der generierte DNA-Einzelstrang als Genom in vorgeformte Kapside verpackt werden kann, durchläuft der Doppelstrang erneut den Zyklus von „terminal resolution“ und Reinitiation. Bei jedem vollständigen Durchlauf dieses Zyklus wird ein neues einzelsträngiges DNA-Genom generiert.

Dieses Modell wird durch eine ganze Reihe von experimentellen Befunden gestützt. Die entsprechenden Replikationsintermediate konnten sowohl *in vivo* (275) als auch in rekonstituierten AAV Replikationssystemen nachgewiesen werden (209). In Replikationsintermediaten und in enkapsidierter AAV-DNA findet man, wie durch dieses Modell vorhergesagt, zwei Orientierungen (als Flip und Flop bezeichnet) der ITRs ((172, 252). Rep78 und Rep68 können in rekonstituierten Systemen *in vitro* den sequenzspezifischen Einzelstrang-Schnitt katalysieren. und besitzen darüber hinaus eine ATP abhängige DNA-DNA und DNA-RNA Helikase Aktivität (320). Eine der Voraussetzungen für den Einzelstrang-Schnitt ist die Bindung von Rep78 oder Rep68 an die ITRs in der Haarnadel-Konfiguration. Für diese Bindung sind im Wesentlichen zwei Rep-Bindungselemente (RBE) innerhalb der ITRs erforderlich: (I) Eine lineare 20 bis 22 Basenpaare lange Sequenz innerhalb des Stammes der Haarnadelstruktur, die aus vier Wiederholungen der Basenfolge GAGC besteht und zwei bis sechs Moleküle Rep78/Rep68 binden kann (46, 182, 247, 273) und (II) ein GTTTC Motiv in demjenigen ITR-Palindrom, welches den größten Abstand zur TRS-Schnittstelle besitzt (25, 247). Dieses Motiv wird als RBS' bezeichnet und ist zusammen mit weiteren Basen innerhalb des kleinen internen Palindroms für die ungefähr 100-fach erhöhte Bindungsaffinität von Rep an die ITRs in der Haarnadel-Konfiguration im Vergleich zur linearen Konfiguration verantwortlich (183). Nach der Bindung an die ITRs kommt es durch die Helikase-Aktivität von Rep78/Rep68 zu einer Exposition der TRS-Sequenz als

DNA-Einzelstrang (26, 57). Die eigentliche Rep vermittelte Endonuklease Reaktion ist im Gegensatz zur Rep Helikase Aktivität nicht ATP abhängig (26). Die TRS besteht aus den Basen 3'-CCGGT/TG-5', wobei der Schnitt zwischen den beiden Thymidin-Resten erfolgt (120). Diese Sequenz wird nur auf dem richtigen DNA-Strang erkannt und Sequenzveränderungen im komplementären DNA-Strang haben keinen Einfluss auf die Effektivität der Endonuklease-Reaktion (26). Im Verlauf der Endonuklease-Reaktion wird eine kovalente Bindung zwischen der Aminosäure 156 der AAV-2 Rep78/Rep68 Proteine und dem freien 5'-Phosphat-Ende der Schnittstelle geschlossen (57, 120). Diese Bindung bleibt im Verlauf der weiteren Teilschritte der DNA-Replikation und anscheinend auch während der Verpackung der Einzelstrang-DNA in vorgeformte Kapside erhalten (66, 151). In aufgereinigten reifen Viruspartikeln lässt sich jedoch kein Rep Protein mehr nachweisen (151, 344). Nach der endonukleolytischen Spaltung an der TRS wird die Haarnadelstruktur des ITR durch die Helikase Aktivität von Rep78/Rep68 entwunden und eine zelluläre DNA Polymerase, entweder  $\delta$  oder  $\epsilon$ , kopiert anschließend den restlichen ITR. Bisher gibt es keine Hinweise, dass eine zelluläre oder im Falle von HSV als Helfer eine virale Helikase an der Entwindung der Haarnadelstruktur beteiligt ist. Außer für die bereits genannten zellulären Faktoren wird noch für zwei weitere zelluläre Proteine eine Rolle bei der AAV DNA Replikation postuliert. HMG1 (high mobility group protein 1) bindet an kreuzförmige DNA, die unter anderem als Intermediat bei der AAV DNA Replikation entstehen kann und es konnte gezeigt werden, daß HMG1 sowohl an die AAV ITRs als auch an die AAV Rep Proteine binden kann (53). Es stimuliert die Rep vermittelte Spaltung der TRS Sequenz und die ATPase-Aktivität von Rep und ist möglicherweise direkt an der AAV DNA Replikation beteiligt. FKBP52 (52 kDa FK506 binding protein) bindet an die so genannte D-Sequenz der AAV-ITRs, wenn diese als Einzelstrang-DNA vorliegt (231, 233). Bei der D-Sequenz handelt es sich um die proximalen 20 Nukleotide der ITRs, die auf Grund fehlender Basenpaarung nicht an der Ausbildung der Haarnadelstruktur beteiligt sind. Der Phosphorylierungsstatus von FKBP52 beeinflusst die AAV DNA-Zweitstrangsynthese, die essentiell ist für die AAV DNA Replikation und Transkription. Bindet die phosphorylierte Form des Proteins an die D-Sequenz, kommt es zur Inhibition der Zweitstrangsynthese und das erste Intermediat der AAV DNA Replikation kann nicht gebildet werden. Liegt das Protein dagegen in der nichtphosphorylierten Form vor, wird die Zweitstrangsynthese nicht inhibiert und die DNA Replikation kann fortschreiten. Die Phosphorylierung von FKBP52 wird durch die EGFR (epidermal growth factor receptor) Tyrosinkinase katalysiert (175).

### **1.2.5 Enkapsidierung der AAV-DNA**

Der Zusammenbau der infektiösen AAV-Partikel erfolgt in zwei Schritten. Zunächst werden aus den monomeren Kapsidproteinen leere Kapside gebildet, die in einem zweiten, langsamer verlaufenden Schritt mit den bei der AAV-DNA Replikation gebildeten einzelsträngigen

Genomen gefüllt werden (203). Während die AAV-DNA Replikation und die Kapsidbildung in den frühen Phasen der produktiven AAV Replikation räumlich und zeitlich getrennt voneinander in spezifischen Unterstrukturen innerhalb des Zellkerns ablaufen, scheinen sich die Rep Proteine, die Kapside und die AAV-DNA während der späten Phasen des Replikationszyklus überlappend im gesamten Nukleoplasma zu verteilen (318). Die nicht an der eigentlichen AAV-DNA Replikation beteiligten kleinen Rep Proteine Rep52/Rep40 und deren 3' – 5'- Helikase Aktivität (272) sind essentiell für die Verpackung der Einzelstrang-DNA in vorgeformte Kapside (40, 140). Als intermediäre Strukturen in der Verpackungsreaktion fungieren dabei wahrscheinlich Komplexe zwischen den großen Rep Proteinen Rep78/Rep68, den kleinen Rep Proteinen Rep52/Rep40, den Kapsiden und der AAV-DNA (66). Einem Modell zufolge können diese Strukturen als immobilisierte Helikase-Komplexe angesehen werden (140). Durch ATP-abhängige Wanderung dieser Komplexe entlang der Einzelstrang-DNA in 3' – 5'-Richtung wird die DNA mit dem 3'-Ende voraus in die leeren Kapside transloziert.

### **1.3 AAV/Rep vermittelte Hemmeffekte**

Für die bisher am besten untersuchten AAV-Serotypen 2, 3 und 5 sind eine ganze Reihe von inhibitorischen Effekten sowohl nach Infektion mit den entsprechenden Virionen als auch nach alleiniger Expression der jeweiligen Rep Proteine beschrieben. AAV und/oder Rep vermittelte Hemmeffekte betreffen die Zellproliferation und den Zellzyklus, die DNA-Amplifikation und Replikation, die Expression heterologer Gene, die Replikation unverwandter Viren sowie die Transformation durch virale und zelluläre Onkogene.

#### **1.3.1 AAV/Rep vermittelte Hemmung der Zellproliferation und des Zellzyklus**

In Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp und der Anzahl der applizierten Viruspartikel pro Zelle kann die Infektion mit AAV zu einer Verringerung der Proliferationsrate (7), zu einer vollständigen Arretierung der Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzykluses (6, 8, 316) oder auch zum Zelltod (95) führen. Eine ausgeprägte Arretierung des Zellzykluses in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase, am G<sub>1</sub>/S Übergang und auch in der späten S oder G<sub>2</sub>-Phase wird dabei nur in primären Zellen, nicht jedoch in immortalisierten Zellen beobachtet (8, 151, 316). In manchen immortalisierten Zellen wurde hingegen eine AAV vermittelte Induktion von Differenzierungs-assoziierten Antigenen gefunden (143). Diese Effekte sind abhängig von hohen Virus-Dosen, jedoch unabhängig von viraler Replikation und *de novo* Genexpression, wie mit UV inaktiviertem Wildtyp-Virus und rekombinanten AAV-Partikeln gezeigt werden konnte (151, 316). Die Zellzyklus-Arretierung ist transient, da Trypsinierung und erneutes Kultivieren der Zellen ein Fortschreiten des Zellzykluses erlauben (8, 151). Dieser Befund spricht dafür, dass eine Integration der AAV-DNA in das zelluläre Genom nicht ausreichend



ist für die Arretierung, da auch die rekultivierten Zellen noch integriertes AAV enthalten. Jedoch kann die Integration von AAV in Abwesenheit von Helfervirus zu einer ganzen Reihe von Veränderungen im Phänotyp der latent infizierten Zelle führen. So zeigen diese Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien wie beispielsweise UV-Licht oder chemischen Karzinogenen (296, 297) und auch die DNA Amplifikation nach Behandlung mit genotoxischen Agenzien wird durch eine integrierte AAV/Neomycin-Resistenz-Kassette inhibiert (317). Auf molekularer Ebene wurde nach AAV Infektion primärer menschlicher Fibroblasten eine Hochregulation der Expression des Inhibitors der Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK), p21<sup>WAF1</sup>, und eine daraus resultierende Hypophosphorylierung verschiedener Mitglieder der Retinoblastoma-Tumorsuppressor-Proteinfamilie (pRB) beschrieben (96). In welchem Umfang die Arretierung des Zellzyklus wirklich unabhängig ist von der Expression der viralen Rep Proteine, ist noch nicht vollständig geklärt, da sowohl in Wildtyp-AAV-Präparationen als auch in rekombinanten AAVs Rep78 als Bestandteil des viralen Kapsids nachgewiesen werden konnte (151).

Die alleinige Expression von Rep68 induziert einen Zellzyklus-Arrest in der G<sub>1</sub> und der G<sub>2</sub> Phase des Zellzyklus mit einer deutlichen Induktion des CDK-Inhibitors p21<sup>WAF1</sup>, während Rep78 exprimierende Zellen zusätzlich eine Arretierung in der S-Phase und die Akkumulation der hypophosphorylierten Form des Retinoblastoma-Proteins p105 zeigen. Auch in Zellen mit induzierbarer Rep78 Expression wurde nach Induktion eine reversible Arretierung der Zellen in der S-Phase und eine damit verbundene Verlangsamung der Zellproliferation gefunden (331).

Unabhängig von der Expression der Rep Proteine kann die AAV-DNA auf Grund ihrer einzelsträngigen Struktur zu einem Zellzyklus-Arrest in der G<sub>2</sub> Phase führen, verbunden mit einer Zunahme der Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 und des CDK-Inhibitors p21<sup>WAF1</sup> (235). In p53 negativen Zellen führt die AAV-Einzelstrang-DNA zu einer Induktion der Apoptose (235).

### **1.3.2 AAV/Rep vermittelte Hemmung viraler Replikation, zellulärer DNA Replikation und heterologer Genexpression**

Während sowohl Adenoviren als auch Herpes-Simplex-Viren Helferfunktionen für eine produktive AAV-Infektion bereitstellen, kann umgekehrt der Verlauf der Adenovirus und Herpesvirus Infektion durch die Koinfektion mit AAV stark beeinflusst werden. Die DNA Replikation von Adenoviren wird durch infektiöses AAV, nicht aber durch defekte Viruspartikel, stark gehemmt (30, 33, 162). In Übereinstimmung mit diesen Befunden kommt es nach Expression des AAV-2 Rep78 Proteins zu einer Inhibition der Bildung der adenoviralen, subnukleären Replikationszentren (309). Auch die Bildung des E2A Genprodukts von Adenovirus wird sowohl durch Rep Expression als auch durch eine Koinfektion mit Wildtyp-AAV, nicht aber durch die Gabe von rekombinanten AAVs oder UV behandeltem Virus inhibiert (124). Die Hemmung der adenoviralen Replikation durch AAV

kann bei einem hohen Überschuss von infektiösen AAV Virionen sogar zu einer Autoinhibition der AAV Replikation in Folge unzureichender Expression der adenoviralen Helferfunktionen führen. Die Hemmung der Replikation des Helfervirus HSV-1 durch die AAV Subtypen 2, 3 und 5 ist nicht so ausgeprägt wie die der adenoviralen Replikation, was unter Umständen auf den wesentlich schnelleren Replikationszyklus von HSV in Zellkultur zurückzuführen ist. Auch hier ist die Stärke der Hemmung abhängig von der Anzahl der AAV-DNA Moleküle, jedoch unabhängig von AAV-DNA Replikation und Genexpression (9). Im Widerspruch dazu konnte jedoch gezeigt werden, dass die AAV Rep Proteine die HSV-1 Replikation und auch die durch HSV-1 induzierte SV40 Amplifikation durch Wechselwirkung mit den HSV-1 Replikationsgenen inhibieren können (93, 144). Rep hemmt ferner die DNA Replikation des Bovinen Papillomvirus BPV (100), die SV40 DNA Replikation und die zelluläre DNA Replikation (330). Die Expression von Rep78 führt auch zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Bildung von infektiösen HIV-(Humanes Immundefizienz Virus)-Partikeln in menschlichen 293, SW480 und HeLa-Zellen (3, 242).

AAV inhibiert die stabile Transformation von menschlichen und Nagerzellen durch selektierbare Markergene unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotors, des HSV Thymidinkinase (TK)-Promotors und des induzierbaren Maus-Metallo-Thionein (MMT)-Promotors (157). Unter den Versuchsbedingungen kommt es dabei nicht zu einer Rep-vermittelten Induktion des Zelltods oder einer Verringerung der Anzahl der stabil integrierten Kopien des transformierten Markergens. Da für den inhibitorischen Effekt auch keine AAV DNA Replikation benötigt wird, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Reduktion der Transformationsrate durch die Rep-vermittelte Hemmung der entsprechenden Promotoren verursacht wird. Diese Schlussfolgerung wird gestützt die Ergebnisse transienter Transfektionen, in denen die Expression von Rep zu einer Hemmung der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)-Reporter-gen-Aktivität unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotors führt (289). Auch eine Vielzahl anderer heterologer Promotor/Enhancer Elemente werden durch Rep in transienten DNA-Plasmid-Transfektionen gehemmt. Diese Promotoren wurden jedoch nie im zellulären Kontext, d.h. als Bestandteil von Chromosomen, untersucht und nur in den wenigsten Fällen ist geklärt, ob die Inhibition auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene erfolgt. So inhibiert Rep78 die BPV-1 Genexpression (98), die Promotoren der Onkogene H-ras (101), c-fos und c-myc (99), die regulatorische Region (URR) des Humanen Papillomvirus Typ16 (HPV16) (97) und die Kontrollregion (LTR) von HIV (3, 242). Die Rep vermittelte Hemmung der HIV-LTR getriebenen Genexpression scheint auf der Ebene der Transkription stattzufinden, da man eine starke Reduktion aller HIV-Transkripte findet. Noch wesentlich stärker als die basale HIV-Genexpression hemmt Rep die durch das HIV-Transaktivatorprotein Tat induzierte HIV-Expression (3). Die Mechanismen der Rep-vermittelten Hemmung heterologer Promotoren waren bislang nur unzureichend geklärt. Spezifische cis-Elemente, die in der Lage sind, die großen Rep Proteine Rep78/Rep68 von AAV zu binden, wurden innerhalb der TAR Region des HIV-LTR Promotors (12), im H-ras Promotor (13) und in der regulatorischen Region von HPV16 (335)

identifiziert. In wieweit diese Rep Bindungselemente allerdings auch an der Rep-vermittelten Hemmung dieser Promotoren beteiligt sind, ist noch unklar. Eine der Untersuchungen legt neben einer möglichen Beteiligung der TAR Region vor allem eine entscheidende Rolle der Negativ-Regulatorischen Region (NRE) innerhalb des HIV-LTR an der Rep-vermittelten HIV-LTR Hemmung nahe (212). Für die Hemmung der HPV16 URR besteht ein möglicher Mechanismus in der Verdrängung des TATA Box bindenden Proteins (TBP) durch das Rep78 Protein (277). Die Wechselwirkung von Rep78 mit dem zellulären Transkriptionsfaktor Sp1, die an der Transaktivierung des AAV-2 p19 Promotors in Gegenwart von Adenovirus beteiligt ist, könnte auch eine entscheidende Rolle bei der Inhibierung des H-ras Promotors spielen (103).

### **1.3.3 AAV/Rep vermittelte Hemmung der Zelltransformation**

Onkogene Adenovirus Subtypen induzieren in neugeborenen Hamstern Tumore. Durch Koinfektion mit AAV kommt es sowohl zu einer Reduktion der Tumorbildung als auch zu einer Verlängerung der Zeitspanne bis zur Manifestation der Tumore (141, 179). AAV inhibiert auch die Zelltransformation durch Adenoviren. Mit AAV infizierte, Adenovirus transformierte Hamsterzellen hatten in neugeborenen Hamstern ein deutlich geringeres onkogenes Potential als nicht mit AAV infizierte Zellen, obwohl in Zellkultur keine Unterschiede in der Proliferationsrate zu beobachten waren (214). Die Transformationshemmung beruht wahrscheinlich hauptsächlich auf einer starken Reduktion der E1B Expression in den AAV infizierten Zellen (214). Präparationen von so genannten defekten interferierenden (DI) Viruspartikeln von AAV, die eine starke Anreicherung der ITRs von AAV aufweisen, führten im Vergleich zu infektiösen AAV Virionen zu einer noch stärkeren Hemmung der Zelltransformation (58). Dies hat zu der Hypothese geführt, dass die AAV ITRs möglicherweise ausreichend sind für die Hemmung der onkogenen Wirkung von Adenoviren. Auch die Onkogenität von HSV-2 transformierten Zellen wird durch eine Infektion mit AAV stark reduziert, es kommt sowohl zu einer verminderten Inzidenz als auch zu einer verlängerten Induktionsdauer der Tumorbildung (54). Auch wurde in den Tieren, die trotz AAV Infektion der injizierten Zellen einen Tumor entwickelten, im Gegensatz zu den Tieren, denen nicht-infizierte Zellen gespritzt wurden, kein Hinweis für die Bildung von Metastasen gefunden. Durch Infektion mit AAV wird auch die Tumorigenität von H-ras transformierten NIH 3T3 Zellen in Nacktmäusen reduziert. Auf die Expression des Rep78 Proteins kann die AAV vermittelte Hemmung der Zelltransformation durch das bovine Papillomvirus (BPV) und das menschliche Papillomvirus 16 (HPV16) zurückgeführt werden (98, 295). Weiterhin hemmt Rep78 die Transformation von Maus-Fibroblasten durch SV40 DNA oder die Kombination der Onkogene E1A und *ras* (137). Diese Hemmung, die für die Rep Proteine Rep68, Rep52 und Rep40 nicht beobachtet wird, könnte im Falle von E1A/*ras* auf einer Hemmung der entsprechenden Onkogen-Promotoren beruhen.

Diese Befunde einer AAV vermittelten Hemmung der Tumorentstehung in verschiedenen Modellsystemen werfen die Frage nach möglichen tumorsuppressiven Eigenschaften von AAV beim Menschen auf. Die Ergebnisse seroepidemiologischer Untersuchungen legen tatsächlich eine Verringerung des Krebsrisikos beim Menschen durch eine Infektion mit AAV nahe. In den untersuchten Altersgruppen wiesen ungefähr 70 bis 80% der Bevölkerung Antikörper gegen AAV-2 oder den eng verwandten Subtyp AAV-3 auf. In den Seren von Krebspatienten, und dabei insbesondere bei Patienten mit Genitalkrebs, wurden deutlich niedrigere AAV-2 und AAV-3 Antikörper-Konzentrationen als in Seren von gesunden Kontrollpersonen gefunden (178). Dagegen bestanden bezüglich der Titer an Herpes-Antikörpern keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Antikörper gegen AAV-5 konnten bei ungefähr 60% der erwachsenen Bevölkerung nachgewiesen werden. Auch für diesen Subtyp wiesen Cervix-Karzinom Patienten um den Faktor 3 niedrigere Antikörper-Titer auf als gesunde Kontrollpersonen (81).

## **1.4 Die AAV Rep Proteine**

### **1.4.1 Funktionelle Eigenschaften und Domänen der Rep Proteine**

Vier verschiedene AAV-2 Rep Proteine, die auf Grund ihrer Laufeigenschaften in SDS-Polyacrylamidgelen als Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 bezeichnet werden, sind immunologisch identifiziert worden (188) und mittels verschiedener prokaryotischer und eukaryotischer Expressionsvektoren exprimiert und gereinigt worden. Während die großen Rep Proteine Rep78 und Rep68 ausschließlich nukleär lokalisiert sind, findet man die kleinen Rep Proteine Rep52 und Rep40 zu einem gewissen Anteil auch im Zytoplasma (188, 319). Die Rep Proteine besitzen verschiedene enzymatische Aktivitäten, die essentiell sind für die produktive AAV Replikation in Gegenwart von Helfervirus und auch für die ortsspezifische Integration in Abwesenheit von Helfervirus. Diese Aktivitäten können teilweise definierten Bereichen der primären Rep-Aminosäuresequenz zugeordnet werden. So verfügen die kleinen Rep Proteine Rep52/Rep40, denen die Amino-terminale DNA-Bindungsdomäne der großen Rep Proteine fehlt, wie diese noch über eine 3'-5' Helikase Aktivität (272). Die Rep78 und Rep52 assoziierten DNA-DNA Helikase Aktivitäten sind ebenso wie die für Rep78 beschriebene DNA-RNA Helikase Aktivität ATP abhängig (120, 272) und sowohl Rep78 als auch Rep52 besitzen ATPase Aktivität (272, 320). Im zentralen Teil der Rep Proteine befindet sich ein Nukleotid-Bindungs-Motiv (Rep78 Aminosäuren 334 bis 349) und eine Punktmutation der Rep78 Aminosäure 340 (entspricht Rep52 Aminosäure 116) von Lysin zu Histidin führt zu einem Verlust der ATPase und Helikase Aktivität von Rep78 und Rep52. Auch Punktmutationen in verschiedenen putativen Helikase-Motiven, die bei den Nichtstrukturproteinen von Parvoviren konserviert sind, führen zu einer starken Reduktion der Helikase-Aktivität und der ATPase Aktivität (294). Während die Helikase-Aktivität der

großen Rep Proteine Rep78/Rep68 im Verlauf der AAV DNA Replikation wahrscheinlich sowohl an der Auflösung der ITR-Haarnadelstruktur als auch an dem Reinitiationsschritt und der Verdrängung des zu verpackenden Einzelstrangs beteiligt ist (321), ist die Helikase-Aktivität der kleinen Rep Proteine essentiell für die Verpackung der replizierten AAV-Einzelstrang-DNA in vorgeformte Kapside (140). Ein zweigeteiltes Kernwanderungssignal (NLS) befindet sich zwischen den Rep78 Aminosäure-Positionen 483 bis 519 (332). Die Amino-terminalen 251 Aminosäuren von Rep78 und Rep68 sind ausreichend für deren Endonuklease-Aktivität an Einzelstrang-DNA-Substraten mit der AAV TRS-Sequenz. Für die Bindung von Rep78 und Rep68 an die AAV-ITRs sind sowohl die Amino-terminalen 240 Aminosäuren von Rep78 und Rep68 erforderlich, welche die Spezifität der Bindung vermitteln, als auch zusätzliche Elemente innerhalb des zentralen Teils der Rep Proteine (181, 217, 310, 332). Verschiedene Befunde legen nahe, dass Rep78 und Rep68 als Oligomere an DNA binden und dass die Oligomerisierung über diese Sequenzelemente im zentralen Teil der Rep Proteine vermittelt wird (273, 310). In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigen chimäre Proteine bestehend aus dem Amino-Terminus von Rep78/Rep68 und einer unverwandten Oligomerisierungsdomäne ebenfalls eine spezifische Bindung an die AAV-ITRs (34). Mögliche Protein-Protein-Interaktionsdomänen innerhalb der großen Rep Proteine sind zwei so genannte „coiled-coil“-Wiederholungen (Aminosäuren 164 bis 182 und 441 bis 483), das Nukleotid-Bindungs-Motiv und ein putativer alpha-helikaler Bereich (Aminosäuren 371 bis 393). Ein funktionelles Nukleotid-Bindungs-Motiv ist für die Bindung von Rep78/Rep68 an die AAV-ITRs *in vitro* nicht erforderlich (216), neben der Helikase-Aktivität geht aber auch die Rep78/Rep68 vermittelte Transaktivierung des AAV-2 p40 Promotors bei Mutation dieses Motivs verloren. Generell zeigen Helikase negative Rep Punktmutanten auch keine oder nur eine stark verminderte Transaktivierung des p40 Promotors, was zu der Hypothese einer Beteiligung der Rep Helikase-Aktivität an der Transaktivierung geführt hat (181). Innerhalb des Amino-Terminus der großen Rep Proteine wurden eine Reihe von Aminosäuren identifiziert, die für die Bindung an die ITRs erforderlich sind (56, 78, 290). Der N-Terminus von Rep78/Rep68 enthält auch verschiedene Motive (Aminosäuren 9 bis 14, 89 bis 94 und 146 bis 156), die charakteristisch sind für sogenannte RCR-Proteine (rolling circle replication initiator proteins) (119) und Mutationen in diesen Motiven führen zu einem Verlust der Endonuklease-Aktivität (290). Eines dieser konservierten Motive beinhaltet den Tyrosin-Rest an Aminosäure-Position 156, der eine kovalente Bindung mit dem 5'-OH Ende des geschnittenen Einzelstranges an der TRS-Sequenz ausbildet (57, 271). Die Röntgenstrukturanalyse der Amino-terminalen Domäne von AAV-5 Rep78 weist auf eine enge strukturelle Verwandtschaft zu den DNA-Bindungsdomänen anderer viraler Replikationsproteinen wie dem E1 Protein der Humanen Papillomviren und dem großen SV40 T Antigen hin (107).

### 1.4.2 Wechselwirkung der AAV Rep Proteine mit zellulären Proteinen

Es sind bereits verschiedene zelluläre Interaktionspartner der AAV Rep Proteine beschrieben, deren Beteiligung an der AAV Replikation und der Vermittlung der vielfältigen inhibitorischen Effekte der Rep Proteine jedoch nur ansatzweise geklärt ist. Die großen Rep Proteine Rep78/Rep68 binden an den zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 und dieser Interaktion wird sowohl eine Rolle bei der Transaktivierung des AAV-2 p19 Promotors (222) als auch bei der Inhibition heterologer Promotoren zugeschrieben (103). Rep78 ist in der Lage, ternäre Komplexe mit dem chromosomalen Nicht-Histon Protein HMG1 und DNA *in vitro* auszubilden (53). Die Bildung von Rep78-AAV-ITR-Komplexen, die TRS spezifische Endonuklease- und die ATPase Aktivität von Rep78 werden *in vitro* durch gereinigtes HMG1 stimuliert, ebenso die Rep78 vermittelte Repression des AAV-2 p5 Promotors nach Kotransfektion von HMG1. Eine Bindung von Rep78 an eine Komponente des generellen Transkriptionskomplexes, dem TATA-Box bindenden Protein (TBP), wurde im Hefe „Two-hybrid“-System und in Bindungsassays mit bakteriell exprimierten oder *in vitro* transkribierten/translatierten Proteinen beschrieben (104). Die funktionellen Auswirkungen dieser Interaktion sind jedoch bisher nicht untersucht. Ebenfalls mit Hilfe des Hefe „Two-hybrid“-Systems wurden Mitglieder des cyclo-AMP (cAMP) Signaltransduktionsweges, die Proteinkinase A (PKA) und die eng verwandte X-chromosomal kodierte Proteinkinase PRKX, als Bindungspartner der AAV Rep Proteine identifiziert (48, 64). Rep78 und Rep52 binden über ihre Carboxy-terminale Domäne, die vom AAV-2 Intron kodiert wird, an die katalytischen Untereinheiten dieser Proteinkinasen und inhibieren als Pseudosubstrat deren Kinase-Aktivität (261). Dies führt zu einer starken Inhibition PKA responsiver Genprodukte wie CREB (cyclic AMP responsive-element-binding protein) und Cyclin A (48). Auch für das Tumorsuppressorprotein p53 ist eine Bindung an Rep78 beschrieben und die Degradation von p53 nach Infektion mit Adenovirus kann durch Koinfektion mit AAV-2 inhibiert werden (14). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen sekundären Effekt der Hemmung der adenoviralen Replikation durch AAV-2 handelt.

### 1.4.3 Posttranslationale Modifikationen der AAV Rep Proteine

Die einzige bisher bekannte posttranslationale Modifikation war die Phosphorylierung aller vier Rep Proteine an Serin-Resten (52). Die Hyperphosphorylierung von Rep78 mit Hilfe des Phosphatase-Inhibitors Okadain-Säure führt zu einer Schwächung der Bindung an die AAV-ITRs und zu einer Reduktion der Helikase-Aktivität (206), was auf eine mögliche Funktion der Phosphorylierung bei der Regulation der AAV DNA Replikation hinweist. Die Phosphorylierung von Rep68 innerhalb seiner spezifischen Carboxy-terminalen Region am

Serinrest 535 ist an der Interaktion mit den 14-3-3 Proteinen  $\epsilon$  und  $\gamma$  beteiligt und reprimiert die AAV DNA Replikation (88).

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die molekularen Mechanismen der vielfältigen Effekte der AAV Rep Proteine auf den Zellzyklus, die virale und zelluläre DNA Replikation, die Zelltransformation durch virale und zelluläre Onkogene und die Expression homologer und heterologer Promotoren waren bisher nur ansatzweise untersucht worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher zelluläre Zielstrukturen der AAV Rep Proteine identifiziert und charakterisiert werden. Eine Mutationsanalyse der für die Beeinflussung verschiedener homologer und heterologer Promotoren erforderlichen Domänen der Rep Proteine sowie die Mutationsanalyse der jeweiligen Promotoren sollte dabei erste Aufschlüsse über die mögliche Identität solcher Zielstrukturen liefern. Von besonderem Interesse war die Fragestellung, in welchem Ausmaß die Rep-vermittelte Regulation der Transkription abhängig ist von der Wechselwirkung der Rep Proteine mit cis-aktiven Nukleinsäuresequenzen oder aber von der Wechselwirkung mit zellulären Proteinen. Ausgehend von diesen Befunden sollten dann zelluläre Protein-Interaktionspartner der Rep identifiziert, eingehend charakterisiert und die Bedeutung dieser Interaktionen für die verschiedenen biologischen Funktionen der Rep Proteine untersucht werden. Ein Hauptaugenmerk galt dabei der Identifizierung von zellulären Proteinen mit möglichen onkogenen oder tumorsuppressiven Eigenschaften und ihrer funktionellen Charakterisierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in Form von veröffentlichten Originalartikeln in englischer Sprache dargestellt. Vorangestellt ist jeweils eine kurze Einführung in die spezifische Fragestellung der Arbeit und den verwendeten methodischen Ansatz. Im Anschluss an die Originalarbeit folgt eine abschließende Diskussion mit besonderer Berücksichtigung der seit dem Erscheinen der Originalarbeit publizierten Literatur. Teilweise werden weiterführende, noch nicht publizierte bzw. zur Publikation eingereichte Experimente kurz dargestellt.

## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Mutationsanalyse der AAV-2 Rep vermittelten Hemmung heterologer und homologer Promotoren

#### *Originalarbeit:*

Markus Hörer \*, **Stefan Weger** \*, Karin Butz, Felix Hoppe-Seyler, Caroline Geisen und Jürgen A. Kleinschmidt

Mutational Analysis of Adeno-associated Virus Rep Protein-Mediated Inhibition of Heterologous and Homologous Promoters

J. Virol. 1995 Sep; **69** (9), 5485-5496.

\* Gleichberechtigte Erstautoren

#### 2.1.1 Einführung

In Abwesenheit von Helfervirus werden die AAV-2 Promotoren p5, p19 und p40 durch die Rep Proteine in ihrer Aktivität reprimiert. Darüber hinaus sind die AAV-2 Rep Proteine in der Lage, eine Vielzahl von unterschiedlichen heterologen Promotoren zu hemmen, so beispielsweise die regulatorische Region (URR) des Humanen Papillomvirus Typ16 (HPV16), die Kontrollregion (LTR) des humanen Immundefizienz Virus (HIV) und die Promotoren der Onkogene H-ras, c-fos und c-myc. Um zu klären, ob der Rep vermittelten Hemmung von homologen und heterologen Promotoren gemeinsame oder unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen, wurde der Beitrag der einzelnen Rep Proteine und ausgewählter Rep Domänen zur Hemmung der AAV-2 p5 und p19 Promotoren, der HIV-LTR Kontrollregion sowie der regulatorischen Region (URR) des Humanen Papillomvirus Typ18 (HPV18) untersucht. Anhand der in dieser Arbeit erstmalig beschriebenen Hemmung der HPV18-URR wurde darüber hinaus die Rolle einzelner cis-regulatorischer Sequenzen, die als Bindungselemente für sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren wirken, im Detail untersucht. Die Inhibition der homologen AAV-2 Promotoren wurde nach Kotransfektion der entsprechenden Rep Proteine oder Rep Mutanten mit einem Rep-negativen AAV-2 Genom in HeLa Zellen auf der Ebene der p5 und p19 initiierten Messenger-RNAs mittels Northern-Blot Analyse gemessen. Die Analyse der Rep-vermittelten Hemmung der HIV-LTR und der HPV18-URR erfolgte nach Kotransfektion der Rep Proteine mit Reporter-Gen Konstrukten. Um mögliche posttranskriptionelle Effekte der Rep Proteine auszuschließen, wurde für beide Promotoren als Reporter-Gen das  $\beta$ -Globin-Gen gewählt, welches eine sehr stabile Messenger-RNA ausbildet und die entsprechenden Transkripte wurde mittels Northern-Blot Analyse nachgewiesen.



***Originalarbeit:***

Markus Hörer \*, **Stefan Weger** \*, Karin Butz, Felix Hoppe-Seyler, Caroline Geisen und Jürgen A. Kleinschmidt

Mutational Analysis of Adeno-associated Virus Rep Protein-Mediated Inhibition of Heterologous and Homologous Promoters

J. Virol. 1995 Sep; **69** (9), 5485-5496.

\* Gleichberechtigte Erstautoren

### 2.1.3 Abschließende Diskussion

Eines der wesentlichen Ziele dieser Arbeit war es, Aufschlüsse über mögliche Mechanismen der Rep vermittelten Hemmung homologer und heterologer Promotoren zu erhalten. Die starke Übereinstimmung der für die Hemmung der HPV18-URR, der HIV-LTR und der AAV-2 p5 und p19 Promotoren erforderlichen Rep Domänen liefert deutliche Hinweise darauf, dass diesen Hemmprozessen zumindest zum Teil gemeinsame Mechanismen zu Grunde liegen. Es wurden jedoch zwei wichtige Ausnahmen gefunden, die auf zusätzliche, Promotor-spezifische Mechanismen hinweisen. Zum einen wird der AAV-2 p5 Promotor durch ein Rep78 Protein mit einer Punktmutation in der ATP Bindungsstelle ähnlich stark wie durch das Rep78 Wildtyp-Protein gehemmt. Bei den drei anderen untersuchten Promotoren dagegen führt diese Punktmutation zu einem fast vollständigen Verlust der Hemmaktivität von Rep78 bzw. bei den beiden heterologen Promotoren sogar zu einer leichten Aktivierung. Für die in dieser Arbeit verwendete Punktmutation der Rep Aminosäure 340 von Lysin zu Histidin (K340H) und eine weitere Punktmutation in der ATP-Bindungsstelle wurde gezeigt, dass die mutierten Proteine Rep78 und Rep68 die Fähigkeit verlieren, in Gegenwart von Helfervirus die AAV DNA zu replizieren und über die Transaktivierung des AAV-2 p40 Promotors die Synthese der AAV Kapsidprotein zu induzieren (41, 181). *In vitro* wurde gezeigt, dass durch die K340H Punktmutation die ATPase-, die Helikase- und auch die sequenzspezifische Endonuklease-Aktivität von Rep an Doppelstrang-DNA Substraten aufgehoben werden (11, 47, 320). Die DNA-bindenden Eigenschaften der großen Rep Proteine dagegen scheinen durch diese Punktmutation nicht beeinflusst zu werden, da die Rep78K340H-Mutante mit gleicher Affinität an die AAV-ITRs bindet wie das Wildtyp-Protein (215). Für das Wildtyp Rep68 Protein ist eine starke Bindung an den AAV-2 p5 Promotor in der Region zwischen der TATA-Box und der Transkriptions-Initiations-Stelle beschrieben (182). Diese Befunde sind ein starkes Indiz dafür, dass die Hemmung des p5 Promotors überwiegend durch direkte DNA-Bindung der großen Rep Proteine vermittelt wird. Durch diese Bindung kommt es möglicherweise zu einer sterischen Hinderung der Bindung von TBP und/oder dem an die Initiationsstelle bindenden Transkriptionsfaktor YY1 YY1. Alternativ können die aktivierenden Funktionen dieser beiden Proteine durch direkte Protein-Protein Wechselwirkungen aufgehoben werden. Eine Interaktion von Rep78 mit TBP, die abhängig ist von der N-terminalen, DNA bindenden, Rep-Domäne wurde in der Zwischenzeit beschrieben (104). Die Bindungen von Rep68 und YY1 an den p5 Promotor dagegen schließen einander aus, es kommt nicht zur Bildung von gemeinsamen Komplexen auf der p5 DNA (155). In der zitierten Untersuchung wurde auch gezeigt, dass die Hemmung des p5 Promotors durch die Rep68-K340H Mutante nach Mutation der Rep-Bindungsstelle im p5 Promotor aufgehoben ist, während das Wildtyp Rep68 eine zwar reduzierte, aber noch deutliche Hemmaktivität für den mutierten Promotor aufweist. Dies spricht dafür, dass zwei unabhängige Mechanismen an der Rep vermittelten Hemmung des p5 Promotors beteiligt sind. Der erste Mechanismus erfordert dabei die Bindung der großen Rep Proteine an den p5

Promoter, während der zweite abhängig ist von der Integrität der Rep ATP Bindungsstelle. Auch für den p19 Promotor ist in Gelretardations-Versuchen eine Bindung von Rep68 beschrieben, die jedoch bedeutend schwächer ist als die an den p5 Promotor (182). Diese schwache Bindung könnte die schwache residuale Hemmung des p19 Promotors erklären, die für die Rep78K340H Mutante beobachtet wurde. Eine schwache Bindung von Rep78 ist auch für die TAR-Region des HIV-LTR, die eine starke Homologie zum Rep-Bindungs-Element innerhalb des AAV-ITR aufweist, beschrieben (12). Eine mögliche Beteiligung der TAR-Region an der Rep vermittelten Hemmung des HIV-LTR Promotors wurde von Oelze et al. beschrieben (212), konnte in dem hier verwendeten Untersuchungssystem jedoch nicht bestätigt werden. Auch die vollständige Aufhebung der Hemmung des HIV-LTR durch Mutation der Rep ATP Bindungsstelle spricht gegen eine direkte Bindung von Rep an Promotorsequenzen als mögliche Ursache der gemessenen Inhibition. Die ebenfalls untersuchte HPV18-URR weist kein einziges der GAGC Elemente auf, die wesentlicher Bestandteil der Rep-Bindungsstellen auf den AAV-ITRs und im p5 Promotor sind, so dass auch hier eine direkte Bindung von Rep an den Promotor als Hemm-Mechanismus ausgeschlossen werden muss.

Die zweite wichtige Ausnahme von der Regel, dass die gleichen Rep Domänen für die Hemmung aller vier untersuchten Promotoren erforderlich sind, betrifft die vom AAV-Intron kodierte Carboxy-terminale Rep Region von 90 Aminosäuren, die in Rep78 und Rep52, nicht aber in Rep68 und Rep40 enthalten ist. Diese Region ist für die Hemmung der beiden heterologen Promotoren von größerer Bedeutung als für die beiden homologen Promotoren. Ein in dieser Region lokalisiertes Zink Finger Motiv, für das im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Bindung von Zink nachgewiesen werden konnte, ist für diesen Effekt jedoch nicht verantwortlich. In der Zwischenzeit wurden zwei wichtige funktionelle Unterschiede zwischen Rep78 und Rep68 beschrieben. Während sowohl Rep78 als auch Rep68 einen Zellzyklus-Arrest in der G1 und G2 Phase induzieren, führt Rep78 im Gegensatz zu Rep68 zusätzlich zu einer Verlangsamung der S-Phase, begleitet von einer Akkumulation der hypophosphorylierten Form des Retinoblastom Proteins (Rb) (257). Dieser differentielle Effekt von Rep78 gegenüber Rep68 wird durch Punktmutation der an der Zink Bindung beteiligten CXXC Motive im C-Terminus von Rep78 vollständig aufgehoben. Die entsprechenden Punktmutanten waren auch bereits im Rahmen der oben beschriebenen Originalarbeit verwendet worden und die Ergebnisse zeigten, dass die CXXC Motive für die Hemmung der HIV-LTR und der HPV18-URR getriebenen Genexpression nicht erforderlich sind. Diese Befunde sprechen eindeutig gegen eine Beteiligung des Rb induzierten S-Phase Arrestes an der Rep78 vermittelten Inhibition heterologer Promotoren. Rep78 und Rep52 unterscheiden sich von Rep68 und Rep40 auch durch ihre Fähigkeit, an die katalytische Untereinheit der Protein Kinase A (PKA) und deren Homolog PRKX zu binden (48, 64). Diese Bindung führt zu einer starken Inhibition der Kinase-Aktivität von PKA und PRKX. PKA ist eine wichtige Komponente (194) des cyclo-AMP (cAMP) Signaltransduktionsweges. Durch Bindung von cAMP dissoziiert die katalytische PKA Untereinheit vom inaktiven

Holoenzym, transloziert in den Zellkern und phosphoryliert dort den Transkriptionsfaktor CREB. Phosphoryliertes CREB führt dann zu einer Stimulation von Promotoren mit CRE-Sequenzen (cAMP responsive elements) (194). Zu den CREB regulierten zellulären Promotoren gehören beispielsweise der Cyclin A Promotor (62) und der *c-fos* Promotor (256). Beide Promotoren werden durch Rep78 inhibiert (48, 99). Die kompetitive Hemmung der Kinase-Aktivitäten von PKA und PRKX durch Rep78 bzw. Rep52 erfolgt über einen Pseudosubstrat-Mechanismus, wobei für die PKA die Rep78 Aminosäuren 526 bis 621 und für die PRKX die Aminosäuren 526 bis 561 als Pseudosubstrat wirken können (261). Die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten heterologen Promotoren, die HIV-LTR und die HPV18-URR, enthalten keine CRE Elemente. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die durch Rep52 vermittelte Hemmung und ein Teil der Rep78 vermittelten Hemmung dieser Promotoren auf einer Inhibition der CREB abhängigen transkriptionellen Aktivierung beruhen.

Zusammenfassend sind an der transkriptionellen Repression durch die AAV Rep Proteine eine Reihe von möglichen Mechanismen beteiligt, deren Beitrag zur Inhibition einzelner Promotoren stark variieren kann. Die direkte Bindung von Rep an regulatorische Nukleinsäure-Sequenzen scheint nach den vorliegenden Ergebnissen nur für den AAV-2 p5 Promotor von entscheidender Bedeutung zu sein. Gegen eine spezifische Bindung von Rep an cis-regulatorische Sequenzen als Ursache der Hemmung heterologer Promotoren sprechen zum einen die Ergebnisse mit der Rep78K340H Mutante und zum anderen die starke Redundanz von cis-aktiven Elementen, die an der Rep78 vermittelten Hemmung der HPV18-URR beteiligt sind. Ein weiterer möglicher Mechanismus sind Protein-Protein Wechselwirkungen von Rep mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren oder generellen Faktoren, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Bei einer Interaktion mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren müsste Rep an eine breite Palette von Transkriptionsfaktoren binden, um die Befunde der Mutationsanalyse der HPV18-URR zu erklären. Eine solche Wechselwirkung mit den DNA-Bindungsdomänen verschiedener Transkriptionsfaktoren ist beispielsweise für das E1A Protein von Adenovirus beschrieben (168). Nur für wenige Transkriptionsfaktoren wie Sp1 (222) oder c-Jun (228) konnte bisher eine direkte Bindung an Rep gezeigt werden. Wie oben ausgeführt, wird die inhibitorische Aktivität der Carboxy-terminalen Region von Rep78 möglicherweise durch die Bindung an PKA und PRKX vermittelt. Für den Beitrag der N-terminalen Region von Rep78 und Rep68 zur Transkriptionshemmung sollten jedoch neben den DNA bindenden Eigenschaften der Rep Proteine zusätzliche Mechanismen in Betracht gezogen werden, die möglicherweise auf Protein-Protein Wechselwirkungen von Rep mit Komponenten des generellen Transkriptionskomplexes oder akzessorischen Faktoren beruhen.

## **2.2 Analyse der Regulation der AAV-2 Genexpression in Gegenwart von Adenovirus: Die Rolle der AAV-2 Rep Proteine, der AAV-ITRs und der Funktionen des Helfervirus.**

### ***Originalarbeit:***

**Stefan Weger**, Andreas Wistuba, Dirk Grimm und Jürgen A. Kleinschmidt

Control of Adeno-Associated Virus Type 2 Cap Gene Expression: Relative Influence of Helper Virus, Terminal Repeats, and Rep Proteins.

J. Virol. 1997 Nov; **71** (11) , 8437-8447.

### **2.2.1 Einführung**

In Abwesenheit von Helfervirus beobachtet man nach Infektion mit AAV-2 nur eine schwache Akkumulation der von den drei AAV-2 Promotoren p5, p19 und p40 initiierten Transkripte (158, 161). In einer negativen Rückkopplungsschleife wird das niedrige Expressionsniveau der p5 und p19 Promotoren durch die Rep Proteine in allen bisher untersuchten Zelllinien noch weiter reduziert (16, 154). In Gegenwart von Adenovirus findet man eine starke Zunahme der p5, p19 und p40 initiierten Transkripte. Für diese Zunahme ist zusätzlich zum Helfervirus auch ein funktionelles *rep* Gen erforderlich (158, 180). Für ein verbessertes Verständnis der Mechanismen der differentiellen Regulation der AAV Genexpression in Abwesenheit und in Gegenwart von Helfervirus sollten folgende Fragestellungen bezüglich der Transaktivierung der AAV Promotoren in Gegenwart von Helfervirus beantwortet werden, die in bisherigen Untersuchungen nur unzureichend analysiert worden waren: (I) der relative Beitrag adenoviraler Funktionen und des *rep* Gens zur Transaktivierung, (II) die Rolle individueller Rep Proteine und Rep Domänen bei der Transaktivierung, (III) die Abhängigkeit der Transaktivierung von der Rep78/Rep68 induzierten Replikation des AAV-Genoms und (IV) die Untersuchung möglicher posttranskriptioneller Effekte der Rep Proteine auf die Kapsid-Expression. Nach Kotransfektion verschiedener Rep Proteine oder Rep Mutanten zusammen mit Rep-negativen AAV-2 Genomen in Adenovirus infizierte HeLa Zellen wurden die von den p5, p19 und p40 Promotoren initiierten Messenger-RNAs (mRNAs) mittels Northern-Blot Analyse und zusätzlich die durch die p40-mRNAs kodierten Kapsidproteine mittels Western Blot Analyse bestimmt. Die Menge an infektiösem Adenovirus wurde über einen weiten Bereich variiert und es wurden AAV-Genome mit verschiedenen Deletionen im Bereich der invertierten terminalen Wiederholungen ITRs eingesetzt, um die Abhängigkeit der Transaktivierung von der Rep vermittelten Replikation der AAV-Genoms zu untersuchen.

***Originalarbeit:***

**Stefan Weger**, Andreas Wistuba, Dirk Grimm und Jürgen A. Kleinschmidt

Control of Adeno-Associated Virus Type 2 Cap Gene Expression: Relative Influence of Helper Virus, Terminal Repeats, and Rep Proteins.

J. Virol. 1997 Nov; **71** (11) , 8437-8447.

### 2.2.3 Abschließende Diskussion

Die adenoviralen Helferfunktionen üben einen dominierenden Einfluss auf die AAV Genexpression und dabei insbesondere auf die Synthese der durch die p40 Transkripte kodierten Kapsidproteine aus. Der stimulatorische Effekt des Helfervirus wird auf einer untergeordneten Ebene durch die AAV-ITRs als cis-regulatorische Sequenzen und die Rep Proteine als Transregulatoren moduliert. Die Expression der großen Rep Proteine Rep78 und/oder Rep68 führt dabei zu einer weiteren Verstärkung der AAV Genexpression in Gegenwart von Adenovirus, allerdings ist diese Funktion der Rep Proteine abhängig von der Präsenz von AAV-ITR Sequenzen in *cis*. Darüber hinaus findet man eine differentielle Regulation der drei AAV-Promotoren durch die großen Rep Proteine. Während Rep78 und Rep68 den p19 und den p40 Promotor aktivieren, wird der p5 Promotor auch in der Gegenwart von Helfervirus durch die großen Rep Proteine reprimiert.

Einer ganzen Reihe von adenoviralen Funktionen wird eine Rolle bei der Aktivierung der AAV Genexpression zugeschrieben. Nur für das E1A und das E2A Gen wurde dabei eine verstärkende Funktion auf der Ebene der Transkription, und zwar für die p5 und p19 initiierten Transkripte, gefunden (38, 39). Die übrigen adenoviralen Helferfunktionen dagegen scheinen eher posttranskriptionell zu wirken. So führt das Zusammenspiel der adenoviralen E1B und E4 Gene zu einer verstärkten cytoplasmatischen Akkumulation aller AAV mRNAs (161, 253), während die VA RNA und das E2A Gen die Prozessierung der mRNAs beeinflussen und deren Translationsrate erhöhen (122, 123, 204, 313). Die Hypothese einer posttranskriptionellen und damit Promotor-unabhängigen Aktivierung der AAV Genexpression durch Adenovirus wird unterstützt durch die Ergebnisse von Arbeiten, in denen die für Rep bzw. Cap kodierenden Sequenzen durch Reportergene ersetzt wurden. Ein durch die AAV-2 p5, p19 (16) oder p40 Promotoren (287) getriebenes CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) Reportergen wurde nach Adenovirus Infektion in keinem nennenswertem Ausmaß aktiviert.

In unseren Untersuchungen war die Rep78 und Rep68 vermittelte Transaktivierung der p19 und p40 Promotoren abhängig von der Gegenwart zumindest einer vollständigen AAV-ITR Sequenz in *cis*. Eine vergleichsweise geringe Transaktivierung wurde nach Rep68 Expression für ein AAV Plasmid mit einer partiellen ITR-Sequenz mit Rep Bindungsstelle (RBS) und der Schnittstelle für die Rep-Endonuklease-Aktivität (TRS) gefunden. In Abwesenheit von ITR Sequenzen führte nur Rep68, nicht aber Rep78, zu einer residualen p19/p40 Transaktivierung in Gegenwart kleiner Adenovirus-Konzentrationen. Diese Befunde werfen die Frage auf, in welchem Ausmaß die Rep78/Rep68 vermittelte Transaktivierung abhängig ist von der Replikation der zu transkribierenden AAV Sequenzen. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre eine Replikations-unabhängige Enhancer-Funktion der ITRs. Eine solche Enhancer-Funktion der AAV-ITRs wurde erstmalig von Beaton et al. (16) postuliert, und zwar sowohl im Kontext des AAV-Genoms als auch im Kontext eines AAV-2/SV40 (Simian Virus 40) Hybridgenoms. Unsere Deletionsanalyse der für die Rep-

vermittelte Transaktivierung der p19/p40 Promotoren erforderlichen ITR-Sequenzen liefert jedoch sehr deutliche Hinweise darauf, dass hauptsächlich eine ITR vermittelte AAV-DNA Replikation für die Transaktivierung verantwortlich ist. Hierbei können sowohl die Amplifikation der zu transkribierenden Template-DNA als auch eine funktionelle Kopplung von Replikation und Transkription als mögliche Mechanismen eine Rolle spielen. Nur eines der untersuchten AAV-Plasmide, welches 66 Basenpaare der linken ITR Sequenz einschließlich des Rep Bindungselements (RBS) enthielt, zeigte in Abwesenheit einer detektierbaren AAV-DNA-Replikation noch eine nennenswerte Steigerung der AAV-Genexpression nach Koexpression von Rep68. Ein großer Teil der Plasmide, die in vorangegangenen Studien zur Rep vermittelten Regulation der AAV Genexpression verwendet wurden, enthielten entweder zumindest eine vollständige ITR-Sequenz (287, 332) oder aber zwei unvollständige ITR-Sequenzen (158). Da in diesen Arbeiten eine eventuelle Replikation der Template-DNA nicht untersucht wurde, ist die aus diesen Studien gezogene Schlussfolgerung einer Replikations-unabhängigen, Rep vermittelten Transaktivierung der AAV-Promotoren in Gegenwart von Helfervirus nicht absolut stichhaltig. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde von Wang et al. eine DNA Replikation für AAV-Plasmide beschrieben, die entweder eine komplette ITR-Sequenz oder zwei isolierte D-Sequenzen (der ungepaarte endständige Teil der ITRs) enthielten (301). Diese Befunde wurden in neueren Arbeiten zur Untersuchung der AAV-DNA Replikation noch erweitert. Zusätzlich zum allgemein anerkannten Modell der AAV DNA Replikation (siehe Abschnitt 1.2.4) wurde ein alternativer Mechanismus gefunden, der unabhängig vom klassischen Weg über zirkulär-doppelsträngige, monomere DNA-Intermediate verläuft (200). Nur die AD-Domäne der ITRs, die die RBS und die TRS enthält, ist für diesen Replikationsweg erforderlich (200). Diese ITR Sequenzen sind auch in dem AAV-Konstrukt enthalten, für welches noch eine Rep68 induzierte Transaktivierung der p40 abhängigen Genexpression gefunden wurde. Von Pereira et al. (220) wurde eine Rep vermittelte ITR unabhängige Transaktivierung der p19 und p40 Promotoren um den Faktor 2 bis 3 beschrieben, wobei im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit alle vier Rep Proteine gleichzeitig im Kontext des AAV-Genoms und nicht individuelle Rep Proteine unter der Kontrolle des starken heterologen HCMV-Promotor exprimiert wurden. Für diese ITR unabhängige Transaktivierung ist jedoch die Rep-Bindungssequenz im p5 Promotor (p5-RBS) essentiell. Dieser Befund wurde von Pereira et al. durch eine gleichzeitige direkte Bindung der Rep Proteine an die p5-RBS und eine SP1 vermittelte Bindung an p19 und p40 Promotorelemente (221, 222) erklärt und entsprechende DNA-Schleifen zwischen dem p5 und dem p40 Promotor konnten elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (221). In der Zwischenzeit wurde jedoch auch eine ITR unabhängige, durch die p5-RBS und eine TRS im p5 Promotor (302) vermittelte DNA Replikation von AAV-Plasmiden beschrieben (35, 211, 285). Daher ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass auch die ITR unabhängige Aktivierung der p19 und p40 Promotoren abhängig ist von der Replikation der AAV-DNA.



In Übereinstimmung mit den parallel veröffentlichten Untersuchungen von Pereira et al. (220) wird der AAV-2 p5 Promotor in Abwesenheit von ITR Sequenzen in *cis* auch in Gegenwart von Adenovirus durch Rep78 und Rep68 stark inhibiert. Für diese Inhibition ist die p5-RBS notwendig (220), was auf eine direkte Bindung der großen Rep Proteine an den p5 Promotor als möglichen Mechanismus schließen lässt. In Gegenwart der AAV-ITRs ist dieser Effekt zumindest teilweise aufgehoben, wahrscheinlich bedingt durch die DNA Replikation der AAV-Sequenzen. In der Zwischenzeit wurde gezeigt, dass AAV-Genome mit einer Mutation in der p5-RBS sowohl in der Abwesenheit als auch in der Gegenwart von Adenovirus eine erhöhte Expression der p5-Transkripte gegenüber Wildtyp Genomen aufweisen und in der Lage sind, in nicht-infizierten 293 Zellen autonom zu replizieren (303).

Insgesamt unterscheidet sich die Rep vermittelte Regulation der AAV Genexpression auf der Ebene der Transkription in Gegenwart des Helfervirus Adenovirus nicht so stark von der in Abwesenheit von Helfervirus wie bis dahin angenommen. Die transkriptionellen Effekte der Rep Proteine werden jedoch in Gegenwart von Adenovirus überlagert durch die Replikation des AAV Genoms, welche durch die großen Rep Proteine und adenovirale Funktionen induziert wird. Diese führt über die damit verbundene Amplifikation der DNA-Matrize und/oder eine funktionelle Kopplung von Replikation und Transkription zu einer erhöhten Expression aller AAV Transkripte. Den entscheidenden Anteil an der erhöhten AAV Expression in Gegenwart von Adenovirus haben jedoch die adenoviralen Helferfunktionen, die hauptsächlich auf posttranskriptioneller Ebene wirken.

## 2.3 Identifizierung und Charakterisierung von zellulären Interaktionspartnern der regulatorischen (Rep) Proteine von AAV-2

### 2.3.1. Einführung

Zusätzlich zu ihren vielfältigen Aktivitäten bei der Regulation der DNA Replikation und Genexpression von AAV-2 beeinflussen die AAV-2 Rep Proteine auch eine ganze Reihe von biologischen Prozessen wie Zellzyklusprogression, zelluläre und virale DNA Replikation, die Zelltransformation durch verschiedene zelluläre und virale Onkogene und die Replikation unverwandter Viren. Einige zelluläre Faktoren, welche möglicherweise einen Teil dieser diversen Hemmaktivitäten der Rep Proteine vermitteln, wurden bereits identifiziert. Rep78 und Rep68 interagieren mit dem zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 und diese Wechselwirkung scheint sowohl an der Rep vermittelten Transaktivierung der homologen p19 und p40 Promotoren in Anwesenheit von Adenovirus (221, 222) als auch an der Rep vermittelten Hemmung des *H-ras* Promotors beteiligt zu sein (103). Darüber hinaus ist auch eine Bindung der großen Rep Proteine an heterologe DNA-Sequenzen beschrieben, beispielsweise an die TAR-Region des HIV-LTR-Promotors (12) und an den *H-ras* Promotor (13). In welchem Umfang jedoch die direkte Bindung der großen Rep Proteine an *cis*-regulatorische DNA-Elemente zur beobachteten Hemmung der jeweiligen Promotoren beiträgt, ist bisher nicht geklärt. Die in Abschnitt 2.1 beschriebene Mutationsanalyse eines weiteren viralen Promotors, der regulatorischen Region des Humanen Papillomvirus 18 (HPV18-URR), zeigte eine starke Redundanz der für die Hemmung durch die Rep Proteine erforderlichen *cis*-Elemente. Die gemachten Beobachtungen deuten auf eine Wechselwirkung der Rep Proteine mit Komponenten des basalen Transkriptions Apparates oder mit generellen Mediatoren von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren hin.

Zur Identifizierung von zellulären Proteinen, die mit den AAV-2 Rep Proteinen direkt in Wechselwirkung treten können und über diese Wechselwirkung möglicherweise an der Vermittlung der vielfältigen Aktivitäten der Rep Proteine beteiligt sind, wurde ein Hefe basiertes „Two-hybrid“-System verwendet. Das „Two-hybrid“-System erlaubt neben der Untersuchung der Wechselwirkung von zwei definierten Proteinen auch die Identifizierung von potentiellen Protein-Interaktionspartnern eines so genannten „Bait“ (Köder)-Proteins in cDNA Bibliotheken (45, 71). Als Bait-Proteine wurden sowohl das vollständige Rep68 Protein als auch eine Rep Deletionsmutante mit den Rep Aminosäuren 172 bis 530 (M172/530) verwendet. Die M172/530 Mutante besitzt noch die meisten der für die großen Rep Proteine Rep78/Rep68 spezifischen inhibitorischen Effekte. Rep78 fand keine Verwendung als Bait-Protein, da es zu einer erheblichen Hintergrund-Aktivität der Reportergene führte, die einen integralen Bestandteil des Hefe „Two-hybrid“-Systems darstellen. In verschiedenen Screens konnten insgesamt vier potentielle zelluläre Interaktionspartner der großen Rep Proteine identifiziert werden. Dabei handelt es sich um (I)

den transkriptionellen Koaktivator PC4, einen allgemeinen Mediator von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, (II) um das Ubiquitin konjugierende Enzym 9 (UBC9), welches die SUMO-Modifikation von zellulären und viralen Proteinen vermittelt, (III) um Topors, einen Two-hybrid-Interaktionspartner des Tumorsuppressorproteins p53 und der DNA Topoisomerase I, und (IV) um KCTD5, ein bisher nicht beschriebenes Protein unbekannter Funktion. Die Identifizierung dieser zellulären Rep Interaktionspartner, ihre funktionelle Charakterisierung und ihre Bedeutung für den AAV Lebenszyklus bzw. für die pleiotropen Effekte der AAV Rep Proteine sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

### **2.3.2 Interaktion der großen AAV-2 Rep Proteine Rep78 und Rep68 mit dem transkriptionellen Koaktivator PC4**

#### ***Originalarbeit:***

**Stefan Weger**, Meike Wendland, Jürgen A. Kleinschmidt und Regine Heilbronn

The Adeno-Associated Virus Type 2 Regulatory Proteins Rep78 and Rep68 Interact with the Transcriptional Coactivator PC4

J. Virol. 1999 Jan; **73** (1), 260-269.

#### **2.3.2.1 Einführung**

Die positiven Klone, die unter Benutzung der „Bait-Proteine“ Rep68 bzw. der Deletionsmutante M172/530 in cDNA-Bibliotheken aus nichtinfizierten HeLa und 293 Zellen als Rep-Interaktionspartner identifiziert werden konnten, enthielten zum ganz überwiegenden Teil cDNA Sequenzen des transkriptionellen Koaktivators PC4. Während in den cDNA-Klonen aus HeLa Zellen ausschließlich die gesamte kodierende Region von PC4 gefunden wurde, enthielt ein Teil der in einer späteren Untersuchung in einer cDNA aus 293 Zellen identifizierten positiven Klone nur den Abschnitt der PC4 Sequenz, welche für dessen Carboxy-terminale, Einzelstrang-DNA bindende, Domäne kodiert. PC4, ursprünglich auch als p15 bezeichnet, wurde erstmals im Jahre 1994 beschrieben. Seine ursprüngliche Reinigung und Klonierung basierte auf seiner Eigenschaft, in rekonstituierten zellfreien Systemen die Transkriptionsrate in Gegenwart einer ganzen Reihe unverwandter sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren zu verstärken (79, 150). Mit einer Länge von 127 Aminosäuren (AS) ist es ein relativ kleines Protein. Sowohl funktionell als auch strukturell kann es in eine Amino-terminale (AS 1 bis 61) und eine Carboxy-terminale Domäne (AS 62 bis 127) unterteilt werden. Die Funktion von PC4 als transkriptioneller Koaktivator wird hauptsächlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen der Amino-terminalen Domäne vermittelt, die als Brückenglied zwischen Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie wie TFIIA und verschiedenartigen Aktivierungsdomänen von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren fungieren kann (79, 150). Dieser Amino-terminale Bereich enthält zwischen den Aminosäuren 2 bis 22 sowie 50 bis 61 zwei so genannte SEAC-Domänen, die durch eine lysinreiche Region voneinander getrennt sind. Die Bezeichnung SEAC leitet sich aus

aufeinander folgenden Serinresten gefolgt von einer Reihe von sauren (**acidic**) Aminosäuren ab und diese Bereiche weisen starke Homologien zu ähnlichen Domänen in transkriptionellen Aktivatoren der  $\alpha$ -Herpesvirus Unterfamilie wie beispielsweise dem IE62 des Varizella-Zoster-Virus oder dem ICP4 des Herpes Simplex Virus 1 auf (150). Die Phosphorylierung von PC4 an Serinresten der SEAC-Domänen führt zu einer Aufhebung der Interaktion mit den Aktivierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren und damit zu einer Aufhebung der Transkriptions-aktivierenden Eigenschaften von PC4 (80, 150). In Kernextrakten aus HeLa Zellen liegt PC4 ganz überwiegend in der phosphorylierten Form vor, wobei die Phosphorylierung wahrscheinlich durch die Casein Kinase II katalysiert wird (150). Die Phosphorylierung von PC4 führt zusätzlich zur funktionellen Aktivierung der im Carboxyterminus (AS 62 bis 127) lokalisierten Einzelstrang-DNA bindenden Domäne (ssDBD), die in der nichtphosphorylierten Form durch den Aminoterminus „maskiert“ wird. Über diese Domäne wirkt PC4 als starker transkriptioneller Repressor in Bereichen ungepaarter Doppelstrang-DNA, an DNA-Enden und an Einzelstrang-DNA, die zwei antiparallele Stränge ausbilden kann (312). Nach Dimerisierung von PC4 bildet die ssDBD dabei zwei gegenläufige DNA-Bindungskanäle aus, die in der Lage sind, zwei antiparallele DNA-Einzelstränge aufzunehmen (24, 311). Die ssDBD von PC4 weist große strukturelle Ähnlichkeit zu den Einzelstrang-DNA bindenden Domänen von zellulären Replikationsfaktoren wie dem RPA auf.

Nach der initialen Identifizierung von PC4 als Interaktionspartner der großen Rep Proteine mit Hilfe des Hefe-„Two-hybrid“-Systems konnte mit bakteriell exprimierten und gereinigten Proteinen der Nachweis einer direkten Bindung zwischen Rep und PC4 geführt werden. Sowohl im Hefesystem als auch mit den gereinigten Komponenten wurden die für die Interaktion erforderlichen Domänen kartiert und für PC4 auf dessen ssDBD eingegrenzt. Dabei scheint Rep präferentiell an die nichtphosphorylierte Form von PC4 zu binden. Die inhibitorischen Effekte von PC4 auf die AAV Genexpression in Abwesenheit von Helfervirus legen eine Beteiligung von PC4 an der Regulation des AAV Lebenszyklus nahe.

***Originalarbeit:***

**Stefan Weger**, Meike Wendland, Jürgen A. Kleinschmidt und Regine Heilbronn

The Adeno-Associated Virus Type 2 Regulatory Proteins Rep78 and Rep68 Interact with the Transcriptional Coactivator PC4

J. Virol. 1999 Jan; **73** (1), 260-269.

### 2.3.2.3 Abschließende Diskussion und weiterführende Ergebnisse

Der beim „Two-Hybrid-Screening“ von cDNA-Bibliotheken aus HeLa Zellen beobachtete hohe Anteil von PC4-Sequenzen in den als positiv verifizierten Klonen deckt sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (199) (G. Kroner-Lux und G. di Pasquale, persönliche Mitteilungen). In anschließenden Untersuchungen mit einer cDNA Bibliothek aus nichtinfizierten 293 Zellen (mit den adenoviralen E1A und E1B transformierte embryonale humane Nierenzelllinie) wurden zusätzlich zum Volllänge-PC4 auch Klone identifiziert, welche nur die für die PC4 Einzelstrang-DNA-Bindungsdomäne (ssDBD) kodierenden Sequenzen enthielten. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse der Mutationsanalyse der für die Rep-PC4 Interaktion erforderlichen Domänen der beiden Proteine. Sowohl im Hefe-„Two-Hybrid“ System als auch in den GST-Pulldown-Assays mit den gereinigten Proteinkomponenten war die ssDBD von PC4 notwendig und hinreichend für die Bindung an die großen Rep Proteine. Dagegen scheint der Amino-Terminus, der für die Funktion von PC4 als transkriptioneller Koaktivator in rekonstituierten Transkriptionssystemen erforderlich ist, keine Bedeutung für die PC4-Rep Interaktion zu haben. Die großen Rep Proteine binden bevorzugt, jedoch nicht ausschließlich, an die nichtphosphorylierte Form von PC4. Interessanterweise führte die Überexpression von exogenem PC4, bei der eine starke Akkumulation der nichtphosphorylierten, *in vitro* Transkriptions-aktivierenden Form von PC4 beobachtet wird, zu einer starken Inhibition der AAV Genexpression in Abwesenheit von Helfervirus. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass dabei auch die Absolutmenge der phosphoryliertem Form von PC4 stark zunimmt. Diese Ergebnisse und die spezifische Interaktion der Rep Proteine mit der ssDBD von PC4 weisen darauf hin, dass PC4 an der Regulation des AAV Lebenszyklus möglicherweise bevorzugt über seine Funktion als transkriptioneller Repressor beteiligt ist. Wie bereits erwähnt, kommt dieser über die ssDBD vermittelten Funktion von PC4 in Bereichen ungepaarter Doppelstrang-DNA, an DNA-Enden und an Einzelstrang-DNA, die zwei antiparallele Stränge ausbilden, eine entscheidende Bedeutung zu. Da auch die endständigen regulatorischen Genomsequenzen (ITRs) von AAV solche Strukturen ausbilden, wurde in weiterführenden Experimenten zunächst eine mögliche Bindung von PC4 über seine ssDBD an die AAV-ITRs untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl das Volllänge PC4 als auch die isolierte ssDBD in Abwesenheit und auch in der Gegenwart der großen Rep Proteine an die AAV-ITRs in der Haarnadel-Konfiguration binden können (Abb. 4). Bei intermediären Konzentrationen von Rep und PC4 kommt es dabei zur Ausbildung trimerer Komplexe auf der AAV-ITR-DNA, während ein Überschuss eines der beiden Proteine zu einer Verdrängung des jeweils anderen Proteins aus der Bindung an die ITRs führt.

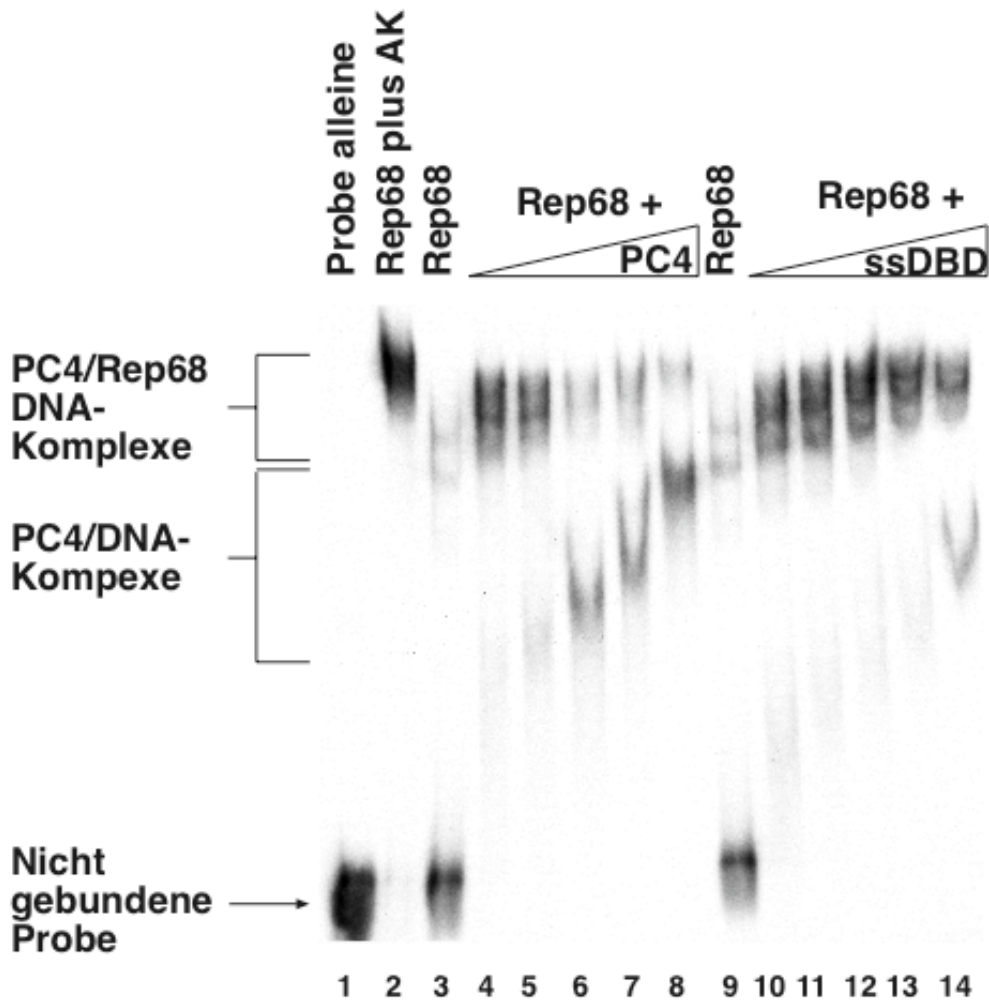


Abbildung 4: Gemeinsame Bindung von Rep68 und PC4 an die AAV ITRs. Eine  $^{32}\text{P}$ -markierte ITR-Probe in der Haarnadel-Konfiguration wurde mit konstanten Mengen von Rep68 (Spuren 3 und 9, Spur 2 mit Rep-AK zur Spezifitätskontrolle) und steigenden Mengen von Volllänge PC4 (Spuren 4 bis 8) bzw. der isolierten ssDBD von PC4 (Spuren 10 bis 14) inkubiert. Das Laufverhalten der Rep68/PC4/DNA-Komplexe bzw. der PC4/DNA ist gekennzeichnet.

Ausgehend von diesen Daten konnte im Rahmen einer Diplomarbeit gezeigt werden, dass PC4 über seine ssDBD die für die AAV DNA Replikation notwendigen enzymatischen Aktivitäten der großen AAV Rep Proteine auf den AAV-ITR's hemmt, sowohl die ATP abhängige Helikase-Aktivität als auch die sequenz- und strangspezifische Endonuklease-Aktivität (245).

Die aus diesen Befunden abgeleitete Hypothese, dass PC4 auch nach AAV Infektion in Gegenwart von Helfervirus als Inhibitor der AAV DNA Replikation und Transkription wirken könnte und dass diese Inhibition durch die Wechselwirkung der großen Rep Proteine mit der PC4-ssDBD aufgehoben wird, wurde im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit überprüft. Dabei wurde die endogene PC4 Aktivität durch verschiedene, komplementäre Ansätze wie

RNA-Interferenz, Überexpression der isolierten PC4 ssDBD und Expression trans-dominant-negativer PC4 Mutanten moduliert (314). Während die Überexpression der PC4 ssDBD zu einer deutlichen Inhibition der AAV DNA Replikation und Genexpression führte, was die obige Hypothese unterstützen würde, war nach Inhibition der endogenen PC4 Expression durch siRNA-Vektoren eine starke Konzentrationsabhängigkeit der jeweiligen Effekte zu beobachten. Intermediäre Konzentrationen der PC4-siRNA-Vektoren führten zu einer Aktivierung der AAV DNA Replikation und Genexpression, höhere Vektorkonzentration dagegen eher wieder zu einer Abnahme dieser beiden Teilprozesse der AAV Replikation. Einschränkend muss gesagt werden, dass auch bei hohen siRNA-Konzentrationen keine komplette Ausschaltung der endogenen PC4 Proteinsynthese erreicht werden konnte, ein Hinweis auf mögliche essentielle Funktionen von PC4 bei der Zellproliferation und damit verbundene autoregulatorische Mechanismen. PC4 ist ein multifunktionelles Protein, das einzelne Teilschritte der AAV Replikation wahrscheinlich auch gegenläufig beeinflussen kann. Eine solche Situation ist für den Einfluss von PC4 auf die SV40 DNA Replikation *in vitro* beschrieben, bei der PC4 die durch das T-Antigen vermittelte Entwindung der Replikationsursprünge verstärkt, aber die RNA-Primer-Synthese und die Elongation durch die Polymerase delta inhibiert, so dass es in Abhängigkeit von der Konzentration sowohl als Aktivator als auch als Inhibitor der DNA Replikation wirken kann (219).

Zusätzlich beeinflusst PC4 die RNA Polymerase II (Pol II) abhängige Genexpression über weitere Mechanismen wie die direkte Inhibition der Phosphorylierung der Pol II (258) oder seine Interaktion mit dem Polyadenylierungsfaktor CstF-64 (28). Seine Interaktion mit TFIIC führt ferner zu einer erhöhten Präzision der Transkriptions-Termination und damit zu einer verstärkten Reinitiation der RNA Polymerase III abhängigen Transkription (304).

Die für die Interaktion von Rep mit PC4 erforderlichen Rep Domänen stimmen größtenteils mit den für die tumorsuppressiven Eigenschaften verantwortlichen Domänen der Rep Proteine überein und in der Zwischenzeit gibt es für PC4 eine Reihe von Hinweisen auf mögliche tumorinhibierende Funktionen. So induziert PC4 in *ras* transformierten humanen Teratokarzinomzellen über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-2 eine Reversion des transformierten Phänotyps (136). Diese Aktivierung von AP-2 wird durch die ssDBD von PC4 vermittelt, die an AP-2 binden kann und wahrscheinlich über eine Repression der AP-2 Transkription zu einer Aufhebung der Selbst-Interferenz dieses Transkriptionsfaktors führt (339). Die ssDBD von PC4 scheint nicht nur an der Regulation der Transkription, sondern auch an Reparaturprozessen zur Behebung von oxidativen DNA-Schäden wie der Transkriptions-gekoppelten DNA-Reparatur (TCR) beteiligt zu sein (300). Möglicherweise führt also eine Reduktion der PC4 Expression zu einem Anstieg der Mutagenese als Folge von spontanen oder oxidativ bedingten DNA-Schädigungen, was mit einem erhöhten Tumorrates verbunden wäre (113). Weiterhin ist PC4 in der Lage, die Funktion des Tumorsuppressors p53 zu verstärken (5) und p53 wiederum führt über den p53-reponsiven PC4 Promotor zu einer verstärkten PC4-Expression (142). Da die großen Rep Proteine ebenfalls mit p53 interagieren (14), ergibt sich ein vielfältiges Geflecht von möglichen



funktionellen Wechselwirkungen. Das Gen für PC4 wurde auf dem menschlichen Chromosom 5p13 kartiert. Diese Region zeigt in vielen Blasen- und Lungentumoren einen Verlust der Heterozygotie (315), ein weiterer indirekter Hinweis auf eine mögliche tumorsuppressive Funktion von PC4.

### **2.3.3 Regulation der Stabilität der großen AAV-2 Rep Proteine Rep78 und Rep68 durch Modifikation mit dem „Small Ubiquitin like Modifier“ (SUMO-1)**

#### ***Originalarbeit:***

**Stefan Weger**, Eva Hammer und Regine Heilbronn

The half-life of the large regulatory protein Rep78 of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) is regulated through SUMO-1 modification

Virology. 2004 Dez; **330** (1), 284-294.

#### **2.3.3.1 Einführung**

Wie beschrieben (siehe Abschnitt 2.3.2), enthielten die meisten der positiven Klone, die mit dem Hefe „Two-Hybrid“-System in cDNA-Bibliotheken aus nicht-infizierten HeLa Zellen als Rep Interaktionspartner identifiziert werden konnten, Sequenzen des transkriptionellen Koaktivators PC4. Um weitere mögliche Rep Interaktionspartner zu identifizieren, wurden daher die ungefähr 200 positiven Klone aus dem „Screen“ mit der Rep M172/530 Mutante einer Kolonie-Hybridisierung mit einer PC4-Hybridisierungsprobe unterworfen. Dabei zeigte sich, dass nur drei der Klone keine Nukleinsäuresequenzen aufwiesen, die entweder identisch oder sehr eng verwandt mit PC4 waren. Zwei dieser Klone enthielten als Fusionspartner der Gal4-Aktivierungsdomäne den vollständigen Leserahmen des SUMO-1 E2 konjugierenden Enzyms UBC9.

UBC9 ist das einzige E2 konjugierende Enzym für SUMO, den „Small Ubiquitin-like Modifier“ (126). Bislang sind in Säugerzellen insgesamt vier SUMO Polypeptide identifiziert worden, die als SUMO-1 bis SUMO-4 bezeichnet werden. (338). Das bisher am besten charakterisierte SUMO-1 besteht aus 101 Aminosäuren und weist wie auch die anderen SUMO Polypeptide bei einer Sequenzhomologie von 18 % eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Ubiquitin auf (15). Nach Abspaltung der vier endständigen Aminosäuren durch eine spezifische Hydrolase und damit verbundener Exposition eines Carboxy-terminalen Di-Glycin Motivs wird es in Analogie zum Ubiquitin über eine Kaskade von E1 aktivierendem Enzym Aos-1/Uba2 (127), dem E2 konjugierenden Enzym UBC9 und verschiedenen E3 Ligasen mit der endständigen Aminogruppe von Lysin-Seitenketten des Zielproteins verknüpft. Für eine basale Modifikation von SUMO-1 Zielproteinen in rekonstituierten *in vitro* Systemen sind das SUMO-1 aktivierende Enzym Aos-1/Uba2 und das E2 konjugierende Enzym UBC9 ausreichend. Viele SUMO-1 Substrate werden dabei an einem Lysinrest

innerhalb der Konsensussequenz  $\psi KXE$  modifiziert (wobei es sich bei  $\psi$  um eine große hydrophobe und bei X um eine beliebige Aminosäure handelt) (243). UBC9 bindet über eine Region um den aktiven Cystein-Rest an Aminosäureposition 93, der für die Thioesterbildung mit SUMO-1 erforderlich ist, direkt an diese Konsensussequenz (18, 251). Eine zweite UBC9 Region bindet SUMO und ist an dessen Transfer vom E1 aktivierenden Enzym beteiligt (283). Jedoch wird die SUMO-Modifikation spezifischer Substrate in Analogie zum Ubiquitin-System durch E3 Ligasen deutlich verstärkt (125, 187). In ihren funktionellen Auswirkungen unterscheiden sich die Modifikation mit Ubiquitin (Ubiquitinierung) und die Modifikation mit SUMO (SUMOlierung) deutlich. Die Modifikation von Proteinen mit bestimmten Arten von Polyubiquitin-Seitenketten (Verzweigung über den Lysin-Rest an Aminosäureposition 48 des Ubiquitins) dient als sekundäres Degradationssignal, welches die modifizierten Proteine dem Abbau im 26S Proteasom zuführt (225). Dagegen wurde der SUMOlierung bisher keine Rolle beim proteolytischen Abbau von Proteinen zugeschrieben (91, 125, 187) (siehe aber Abschnitt 2.3.7). Stattdessen moduliert die SUMOlierung die funktionellen Eigenschaften des Zielproteins wie beispielsweise die intrazelluläre Lokalisation, die transkriptionelle Aktivität und die Wechselwirkung mit anderen Proteinen. Dadurch ist sie maßgeblich an der Regulation einer ganzen Reihe von zellulären Prozessen einschließlich der Genexpression, dem Kerntransport, der Zellzyklusprogression, verschiedenen Signaltransduktionswegen und DNA-Reparaturprozessen, beteiligt (125, 187, 265, 338). Ein funktionelles SUMOlierungs-System ist essentiell für die genomische und chromosomale Stabilität (205). Für viele der zellulären und viralen Proteine, die als Interaktionspartner von UBC9 identifiziert wurden, konnte in nachfolgenden Untersuchungen eine SUMOlierung nachgewiesen werden (186). Auch für die großen AAV-2 Rep Proteine Rep78 und Rep 68 konnten wir eine SUMO-1 Modifikation zeigen. Als hauptsächliche Akzeptorstelle dient dabei der Lysinrest an Aminosäureposition 84, der jedoch nicht vollständig der Konsensussequenz entspricht. Der Austausch dieses Lysinrestes gegen Arginin führt zu einer stark verminderten Stabilität des mutierten Rep78 Proteins, hat jedoch im Kontext einer produktiven Infektion in Anwesenheit von Adenovirus als Helfer keinen Einfluss auf die AAV DNA Replikation, die Genexpression oder die Bildung infektiöser Viruspartikel.

**Stefan Weger**, Eva Hammer und Regine Heilbronn

The half-life of the large regulatory protein Rep78 of adeno-associated virus type 2 (AAV-2) is regulated through SUMO-1 modification

Virology. 2004 Dez; **330** (1), 284-294.

### 2.3.3.3 Abschließende Diskussion

Die großen AAV-2 Rep Proteine Rep78 und Rep68 interagieren mit dem SUMO-1 konjugierenden Enzym UBC9 unter Beteiligung ihrer Amino-terminalen DNA-Bindungsdomäne und werden auch hauptsächlich innerhalb dieser Domäne am Lysinrest an Aminosäureposition 84 mit SUMO-1 modifiziert. Der Sequenzabschnitt um diesen Lysinrest entspricht nicht der Konsensussequenz yKXE, hingegen ist der Lysinrest an Aminosäureposition 447, der in eine solche Konsensussequenz eingebettet ist, nur in untergeordnetem Ausmaß an der SUMOlierung der Rep Proteine beteiligt. Eine ähnliche Situation wurde bei einer Reihe von anderen Proteinen beobachtet, so beispielsweise beim Replikations-Prozessivitätsfaktor PCNA, der hauptsächlich an einer TKET-Sequenz an Position 164 modifiziert wird, während die Konsensussequenz an Position 127 nur bei Punktmutation der hauptsächlichlichen Akzeptorstelle genutzt wird (112). Auch eine Reihe von anderen Proteinen wie der Transkriptionsfaktor TEL, das PML (promyelocytic leukemia protein) und das BZLF1 Protein des Epstein Barr Virus (EBV) werden an Nichtkonsensus-Sites modifiziert (1, 36, 133). Darüber hinaus sind eine Reihe von Proteinen beschrieben, die auch nach Mutation sämtlicher Konsensus-Sites noch modifiziert werden können (128, 191, 238). Ob SUMO-1 E3 Ligasen bei der SUMOlierung von Zielproteinen mit Nichtkonsensus-Akzeptorstellen eine stärkere Rolle spielen als bei der SUMOlierung einer Konsensus-Zielsequenz, wie man auf Grund der direkten Interaktion des E2 Enzyms UBC9 mit dieser Konsensus-Sequenz vielleicht vermuten könnte, ist bisher nicht bekannt. Über die an der SUMOlierung der großen Rep Protein beteiligten E3 Ligasen gibt es bislang ebenfalls keine experimentellen Erkenntnisse. Ein möglicher Kandidat wäre neben den bereits gut charakterisierten SUMO-1 E3 Ligasen wie der PIAS Protein Familie (protein inhibitors of activated STAT) (129, 248, 260) das DNA Topoisomerase I (TOP1) interagierende Protein Topors, welches wir ebenfalls als Rep interagierendes Protein identifiziert haben (siehe Abschnitt 2.3.4) und für welches wir SUMO-1 E3 Ligase Aktivität für p53 und TOP1 nachweisen konnten (siehe Abschnitte 2.3.6 und 2.3.7). Diese Fragestellung soll in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Auch die Frage nach den molekularen Mechanismen für die verminderte Stabilität der weitgehend SUMOlierungs-negativen Rep78-K84R Punktmutante kann im Augenblick noch nicht endgültig beantwortet werden. Für eine mögliche Konkurrenz zwischen SUMOlierung und Ubiquitinierung um den modifizierten Lysin-Rest analog zur Situation beim Inhibitor I $\kappa$ B (63), der die Retention des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B im Zytoplasma vermittelt, gibt es bisher keine Anhaltspunkte. Auch scheint die Konformation der SUMOlierungs-negativen Rep Mutante gegenüber dem Wildtyp Protein nicht sehr stark verändert zu sein, da die für die verschiedenen Teilschritte der produktiven AAV Replikation erforderlichen Rep Aktivitäten wie DNA-Bindung, Helikase- und Endonuklease-Aktivität offensichtlich nicht beeinträchtigt sind. Daher spielt die SUMOlierung der Rep Proteine wahrscheinlich eher eine Rolle bei der latenten AAV

Infektion in Abwesenheit von Helfervirus, bei der die Stabilität der Rep Proteine auf Grund der niedrigen Expressionsrate von größerer Bedeutung ist.

### **2.3.4 Interaktion der großen AAV-2 Rep Proteine Rep78 und Rep68 mit dem p53 und Topoisomerase I bindenden Protein Topors**

#### ***Originalarbeit:***

**Stefan Weger**, Eva Hammer und Regine Heilbronn

Topors, a p53 and topoisomerase I binding protein, interacts with the adeno-associated virus (AAV-2) Rep78/Rep68 proteins and enhances AAV-2 gene expression

J Gen Virol. 2002 März; **83** (Pt 3), 511-516.

#### **2.3.4.1 Einführung**

Ein weiterer PC4-negativer Klon, der beim „Screening“ einer cDNA-Bibliothek aus nichtinfizierten HeLa Zellen als Rep Interaktionspartner identifiziert werden konnten, enthielt die 192 Carboxy-terminalen Aminosäuren von Topors, einem zellulären RING-Finger Protein. Topors war kurz zuvor unabhängig von zwei Gruppen erstmals beschrieben worden. Haluska et al. konnten Topors als Bindungspartner der DNA-Topoisomerase I (87) identifizieren, wodurch dieses Protein mit einer Gesamtlänge von 1045 Aminosäuren auch seine heute gebräuchliche Bezeichnung erhalten hat (**Topors** für **Topoisomerase I** bindendes, **RS**-reiches Protein) (87). Zhou et al. hatten ein Amino-terminal um 230 Aminosäuren verkürztes Polypeptid als Interaktionspartner des Tumorsuppressorproteins p53 kloniert (343) und als p53BP3 bezeichnet. In beiden Studien wurde zur Identifizierung ein Hefe „Two-Hybrid“-System verwendet und im Fall der DNA Topoisomerase I (im Folgenden als TOP1 bezeichnet) wurde die Interaktion zwischen den beiden Proteinen zusätzlich durch GST-Pulldown-Assays bestätigt. Beide Arbeiten beschreiben eine nicht-homogene Lokalisation von Topors in ca. 10 bis 30 punktförmigen Domänen im Nukleus, wobei diese Untersuchungen mit Hilfe von Topors-Fusionsproteinen mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) durchgeführt wurden. Aus keiner der Arbeiten ergaben sich jedoch zunächst weitere Aufschlüsse über eine mögliche Funktion des Proteins.

Im Anschluss an die initiale Identifizierung von Topors als Interaktionspartner der großen Rep Proteine wurde zunächst eine detaillierte Kartierung der dafür notwendigen Rep und Topors Domänen vorgenommen. Eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen konnte in GST-Pulldown-Assays bestätigt werden. Topors Überexpressionsstudien wiesen ähnlich wie bei PC4 auf eine mögliche Funktion bei der Regulation der AAV Genexpression in Abwesenheit von Helfervirus hin. Im Gegensatz zu den bei PC4 beobachteten inhibitorischen Effekten konnte für Topors jedoch eine deutliche Stimulation der AAV Genexpression nachgewiesen werden.

***Originalarbeit:***

**Stefan Weger**, Eva Hammer und Regine Heilbronn

Topors, a p53 and topoisomerase I binding protein, interacts with the adeno-associated virus (AAV-2) Rep78/Rep68 proteins and enhances AAV-2 gene expression

J Gen Virol. 2002 März; **83** (Pt 3), 511-516.

### 2.3.4.3 Abschließende Diskussion

Für die Interaktion von Topors mit den großen Rep Proteinen ist eine zwischen den Aminosäuren 871 und 917 lokalisierte Sequenz im Carboxy-terminalen Teil von Topors erforderlich und ausreichend. Interessanterweise ist der gleiche Abschnitt auch an der Interaktion von Topors mit dem Tumorsuppressorprotein p53 beteiligt, jedoch wurde in Übereinstimmung mit den publizierten Ergebnissen von Zhou et al. (343) eine zweite p53-Bindungsstelle im zentralen Teil des Protein zwischen den Aminosäuren 415 und 737 identifiziert. Durch Kotransfektion mit einem infektiösen AAV-Genom konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Topors zu einer deutlichen Stimulation der Synthese der regulatorischen (Rep) und Strukturproteine (Cap) in Abwesenheit von Helfervirus führt. Die in der Arbeit publizierten Ergebnisse erlauben jedoch keine Rückschlüsse über die Mechanismen der Topors vermittelten Transaktivierung der AAV Genexpression. Während die Arginin-Serin-(RS) reiche Domäne einen Hinweis darauf gibt, dass Topors möglicherweise am mRNA-Spleißing beteiligt ist, fehlt ihm die für Spleiß-Faktoren charakteristische RNA-Bindungsdomäne (76, 334). Das Vorliegen von insgesamt 5 PEST-Sequenzen innerhalb des Topors Leserahmens weist darauf hin, dass es sich bei Topors wahrscheinlich um ein relativ kurzlebiges Protein mit regulatorischer Funktion handelt. PEST-Sequenzen, charakteristische Sequenzmotive mit den Aminosäuren Prolin, Glutamat, Serin und Threonin, sind als regulatorische Elemente entscheidend an der Proteasom vermittelten Degradation von Proteinen beteiligt (240). Indirekte Hinweise auf eine verminderte Stabilität von Topors ergaben sich ferner aus dem relativ geringen Protein-Expressionsniveau nach Transfektion von verschiedenen Topors-Konstrukten in eukaryotische Zellen unter der Kontrolle sehr starker Promotoren wie der frühen Promotor/Enhancer Region des Humanen Cytomegalievirus (HCMV).

### 2.3.5 Modifikation von Topors mit dem Ubiquitin-ähnlichen Polypeptid SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier)

#### *Originalarbeit:*

**Stefan Weger**, Eva Hammer und Markus Engstler

The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation

Exp Cell Res. 2003 Okt; **290** (1), 13-27.

### 2.3.5.1 Einführung

Kim et al. haben erstmals darauf aufmerksam gemacht (139), dass PEST-Sequenzen nicht nur maßgeblich an der Proteasom vermittelten Degradation von Proteinen beteiligt sind, sondern auch charakteristisch sind für Proteine, die mit dem Ubiquitin-ähnlichen Peptid SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier) modifiziert werden können. Topors enthält verteilt über das Protein insgesamt fünf PEST-Sequenzen. Ferner machten wir die Beobachtung, dass Topors nach Infektion mit Adenovirus, einem Helfervirus für die produktive AAV Infektion, innerhalb des Zellkerns eine charakteristische Umverteilung von punktförmigen in lang gezogene, fadenförmige Strukturen durchläuft. Diese erinnerte sehr stark an die durch Adenovirus Infektion induzierte Veränderung der subzellulären Lokalisation des PML Proteins (65), der Hauptkomponente der so genannten „PML oncogenic domains“ (PODs). PODs sind subnukleäre Strukturen, denen eine Beteiligung an sehr vielen nukleären Aktivitäten wie Transkriptionsregulation (341), DNA Reparatur (59), Apoptose (282) und Tumorsuppression (250) zugesprochen wird. PML wird an drei Lysinresten mit SUMO-1 modifiziert (67, 134) und diese SUMOlierung ist Voraussetzung für die Bildung der PODs (159, 340) und die Rekrutierung weiterer Proteine wie dem transkriptionellen Korepressor Daxx (121) in diese subnukleären Strukturen. Daxx und viele weitere Proteine, die mit den PODs assoziieren können, so unter anderen der transkriptionelle Koaktivator CBP (23), p53 (74) oder der p53-Regulator Mdm2 (152), werden ebenfalls SUMOliert.

Ausgehend von diesen indirekten Hinweisen sollte zunächst eine mögliche SUMOlierung von Topors untersucht und in weiterführenden Experimenten dann die Rolle der SUMOlierung bei der Bildung der subnukleären Topors Strukturen charakterisiert werden. Ferner sollte eine mögliche Assoziation dieser Strukturen mit den PODs und anderen subnukleären Domänen wie den Spliceosomen untersucht werden. Spliceosomen sind selber mit den PODs assoziiert und enthalten hauptsächlich Faktoren, die an der RNA Prozessierung beteiligt sind.

Erste Evidenzen für eine mögliche SUMO-1 Modifikation von Topors erhielten wir durch den Nachweis der Wechselwirkung von Topors mit SUMO-1 und dem SUMO-1 konjugierenden Enzym UBC9 mit Hilfe des Hefe „Two-Hybrid“-Systems. Die Modifikation von Topors mit mehreren SUMO-1 Resten konnte dann in einem zellulären System nach Überexpression eines Fluoreszenz-getaggten SUMO-1 Proteins nachgewiesen werden. Die für die SUMOlierung notwendigen Proteindomänen wurden im Detail charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass Topors unabhängig von seiner SUMO-1 Modifikation in den punktförmigen subnukleären Strukturen lokalisiert ist. Die Bildung dieser subnukleären Topors-Strukturen, die in Fluoreszenz-Studien sehr eng mit den PODs assoziiert waren, wird jedoch durch die Überexpression von SUMO-1 verstärkt.



**Stefan Weger**, Eva Hammer und Markus Engstler

The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation

Exp Cell Res. 2003 Okt; **290** (1), 13-27.

### 2.3.5.3 Abschließende Diskussion

Unsere Ergebnisse unterstützen die Validität der Hypothese von Kim et al. (139), dass PEST Sequenzen möglicherweise ein relativ generelles Merkmal von SUMOlierungs-Substraten sind. Während jedoch bei der von Kim et al. untersuchten HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase 2) die PEST-Sequenz für die Interaktion mit UBC9 erforderlich ist, sind die PEST-Sequenzen von Topors nicht direkt an den Wechselwirkungen mit UBC9 oder SUMO-1 beteiligt. Auch für die Interaktionen von p53 (83) und dem PML Protein (67) mit UBC9 sind deren PEST Motive nicht essentiell. Interessanterweise befinden sich jedoch vier der fünf Topors PEST Motive in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Domänen, welche die Interaktion mit UBC9 und SUMO-1 vermitteln. Eine attraktive alternative Erklärungsmöglichkeit für das Vorkommen von PEST Sequenzen in SUMO-Zielproteinen sind die darin enthaltenen SP/TP Motive (186), die als minimale Erkennungssequenzen für Serin- und Threoninkinasen dienen können. Die Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten spielt nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Ubiquitinierung von Proteinen, sondern reguliert in vielen Fällen auch die SUMOlierung. So induziert die Phosphorylierung von I $\kappa$ B an den Serinresten 32 und 36 die Ubiquitinierung und damit die Degradation des Proteins, während die SUMOlierung am gleichen Lysinrest als Gegenspieler der Ubiquitinierung durch die Phosphorylierung inhibiert wird (63). Im Gegensatz dazu stimuliert die Phosphorylierung der MEF2C (myocyte enhancer factor) Transkriptionsfaktoren an SP-Motiven ihre SUMOlierung und führt damit zu einer Transkriptionsrepression (73, 85, 135, 267). Auch im Falle des HSF1 (heat shock factor 1) führt die Phosphorylierung am Serinrest 303 mit nachfolgender SUMOlierung am eng benachbarten Lysinrest 298 zu einer Inhibition der transkriptionellen Aktivierung von HSF1-responsiven Genen (108, 110). Ein gemeinsames, zweiteiliges Motiv, bestehend aus einer SUMOlierungs-Konsensus-Sequenz und einer eng benachbarten SP-Sequenz, das so genannte PDSM („phosphorylation-dependent sumoylation motif“) wurde in vielen SUMO-Zielproteinen identifiziert, die durch sequentielle Phosphorylierung und SUMOlierung reguliert werden (109, 333).

Topors scheint an mehreren Akzeptor-Stellen mit SUMO-1 modifiziert zu werden. Auch nach Punktmutation aller drei Konsensus-Sites wurde noch eine deutliche residuale Modifikation mit mehreren SUMO-1 Resten gefunden. Wie bereits in Abschnitt 2.3.3 ausgeführt, wurden ähnliche Beobachtungen auch für andere Proteine wie das Mdm2 gemacht (191). In Ermangelung einer SUMOlierungs-negativen Topors Punktmutante können die funktionellen Auswirkungen der SUMO-1 Modifikation nicht endgültig bewertet werden. Das stark erhöhte Expressionsniveau von exogenem Topors nach Koexpression von SUMO-1 weist jedoch sowohl auf eine geringe Stabilität des Proteins im nicht-modifizierten Zustand als auch eine mögliche Stabilisierung des Proteins durch die SUMOlierung hin. Zur Klärung dieses Sachverhalts sind für die Zukunft Puls-Chase Experimente zur direkten Bestimmung der Halbwertszeit von Topors geplant.

Während die Lokalisation von Topors in den POD-assozierten Strukturen nicht prinzipiell abhängig zu sein scheint von seiner SUMOlierung, so kommt es doch nach Koexpression von SUMO-1 zu einer wesentlich stärkeren Akkumulation von Topors in diesen Strukturen, die auch in ihrer Größe deutlich zunehmen. In einer parallelen Studie konnten Rasheed et al. (239) ebenfalls zeigen, dass Topors sehr eng mit den PODs assoziiert ist, exogene Topors Proteine aber keine vollständige Kolo-kalisation mit PML zeigen. Für das endogene Topors war jedoch die Überlappung mit den PODs noch stärker ausgeprägt und die Bildung der Topors Strukturen ist PML-abhängig. Ähnliche Beobachtungen wurden für andere PML assoziierte Proteine wie Sp100 (69) und CBP (292) gemacht. Neue Befunde von Shen et al. (268) haben nun zu einem verbesserten Verständnis der Assemblierung der PODs und der Rolle der SUMOlierung von PML und anderen Komponenten bei diesem Prozess geführt. Basierend auf der Identifizierung eines für die Bildung der PODs erforderlichen SUMO Interaktions-Motives (SIM) in PML wurde ein Modell vorgeschlagen, in welchem PML über dieses SIM nicht-kovalent an SUMOlierte Proteine einschließlich PML selbst bindet. Multiple PML Moleküle können so miteinander interagieren und ein makromolekulares Netzwerk bilden, an welches andere Proteine in Abhängigkeit von ihrem SUMOlierungs-Status und/oder der Präsenz eines SIMs in dynamischer Weise rekrutiert werden können. Da Topors ebenfalls zumindest ein SIM enthält (siehe auch Abschnitt 2.3.7), könnte dies die SUMOlierungs-unabhängige Assoziation mit den PODs erklären.

Die PODs sind an sehr vielen nukleären Aktivitäten wie Transkriptionsregulation (341), DNA Reparatur (59), Apoptose (282) und Tumorsuppression (250) beteiligt. Trotzdem ist ihre genaue Funktion immer noch Gegenstand von Kontroversen und verschiedene Modelle wurden zur Diskussion gestellt. Im ersten Modell (207) werden sie als Aggregate von überschüssigen nukleoplasmatischen Proteinen betrachtet, aus denen diese Proteine bei Bedarf freigesetzt werden können. Im zweiten Modell werden sie als Kompartimente für die post-translationale Modifikation und Degradation von Proteinen verstanden, was durch Befunde zur Acetylierung und Phosphorylierung von p53 in den PODs unterstützt wird (55, 114). Das dritte Modell schlägt vor, dass in den PODs und/oder an ihrer Peripherie spezifische molekulare Prozesse wie Transkription und DNA Replikation ablaufen. Belege für eine solche Funktion sind der Nachweis naszierender RNA (22) in der Peripherie der PODs und die Assoziation der PODs mit Transkriptions-aktiven chromosomalen Regionen (298). Die Assoziation von Topors mit den PODs eröffnet die Möglichkeit der Beteiligung an einer Reihe von molekularen Prozessen, entweder direkt oder indirekt über die Modifikation anderer POD Komponenten. Solche Topors-vermittelten Modifikationen von Interaktionspartnern wie p53 und der TOP1 sind in den nächsten Abschnitten dargestellt.

## 2.3.6 Funktionelle Charakterisierung von Topors als SUMO-1 Ligase für das Tumorsuppressorprotein p53

### *Originalarbeit:*

**Stefan Weger**, Eva Hammer, und Regine Heilbronn

Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo

FEBS Lett. 2005 Sep; **579** (22), 5007-5012.

### 2.3.6.1 Einführung

Topors bindet an zwei Komponenten der SUMOlierungs-Maschinerie, an SUMO-1 und an das SUMO-1 konjugierende E2 Enzym UBC9 (Abschnitt 2.3.5). Die Überexpression von Topors induziert in ähnlicher Weise wie die Überexpression von UBC9 die Akkumulation von exogenem SUMO-1 in punktförmigen subnukleären Strukturen, wobei eine praktisch vollständige Kollokalisierung von Topors mit dem exogenen SUMO-1 beobachtet wird. Die subnukleären Topors-Strukturen sind eng mit den PODs assoziiert. Die Relokalisierung von exogenem SUMO-1 aus dem Nukleoplasma in die subnukleären Topors-Strukturen wird dabei auch durch Topors Deletionsmutanten induziert, die selbst nicht mehr mit SUMO-1 modifiziert werden können. Dieser Befund deutete auf eine Beteiligung von Topors an der SUMOlierung anderer Proteine, d.h. eine mögliche SUMO-1 E3 Ligase Funktion hin. Während für eine basale Modifikation von SUMO-1 Zielproteinen in rekonstituierten *in vitro* Systemen das SUMO-1 aktivierende Enzym Aos-1/Uba2 und das E2 konjugierende Enzym UBC9 ausreichend sind, wird die SUMOlierung spezifischer Substrate in Analogie zum Ubiquitin-System durch E3 Ligasen deutlich verstärkt (125, 187). Im Gegensatz zum Ubiquitin-System, bei dem bereits eine Vielzahl von E3 Ligasen identifiziert wurden, die in der Regel an der Modifikation von nur einem oder sehr wenigen spezifischen Substraten beteiligt sind (224), wurden jedoch bisher nur wenige SUMO-1 E3 Ligasen charakterisiert und deren Substratspezifität ist nur schwach ausgeprägt. Eine Klasse von Ubiquitin E3 Ligasen zeichnet sich durch ein gemeinsames RING Finger Motiv aus, welches als molekulares Strukturgerüst zur Übertragung des Ubiquitin-Restes vom E2 Enzym auf das Zielprotein dient (224). Eine Variante dieses Motivs, als SP-RING Motiv bezeichnet (111), findet man auch bei einer Familie von SUMO-1 E3 Ligasen, den PIAS Proteinen (129, 248, 260). Für die E3 Ligase Aktivität der PIAS Proteine, die unter anderem die SUMOlierung des Tumorsuppressorproteins p53 verstärken können, ist deren SP-RING Finger Motiv essentiell. Andere identifizierte SUMO-1 E3 Ligasen wie das Nukleoporin RanBP2 (223) und das Polycomb Protein Pc2 (128) enthalten hingegen kein RING Finger Motiv. In der nachfolgenden Originalarbeit wurde zunächst gezeigt, dass Topors über eine zentrale Domäne, d.h. unabhängig von seinem im Amino-terminalen Teil des Proteins lokalisierten RING Finger Motiv, die Akkumulation von hochmolekularen SUMO-1 Aggregaten in

Kulturzellen induzieren kann. Zur weiteren Untersuchung der potentiellen Topors SUMO-1 E3 Ligase Aktivität wurde dann aus verschiedenen Gründen p53 ausgewählt. Zum einen handelt es sich bei p53 um ein gut charakterisiertes SUMO-1 Substrat, welches praktisch ausschließlich an einer einzigen Lysin-Akzeptorstelle an Aminosäureposition 386 modifiziert wird. Zum anderen war p53 bereits als Topors Interaktionspartner (343) beschrieben worden und von uns eine detaillierte Analyse der dafür notwendigen Topors Domänen durchgeführt worden (307) (Abschnitt 2.3.4).

**Stefan Weger**, Eva Hammer, und Regine Heilbronn

Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo

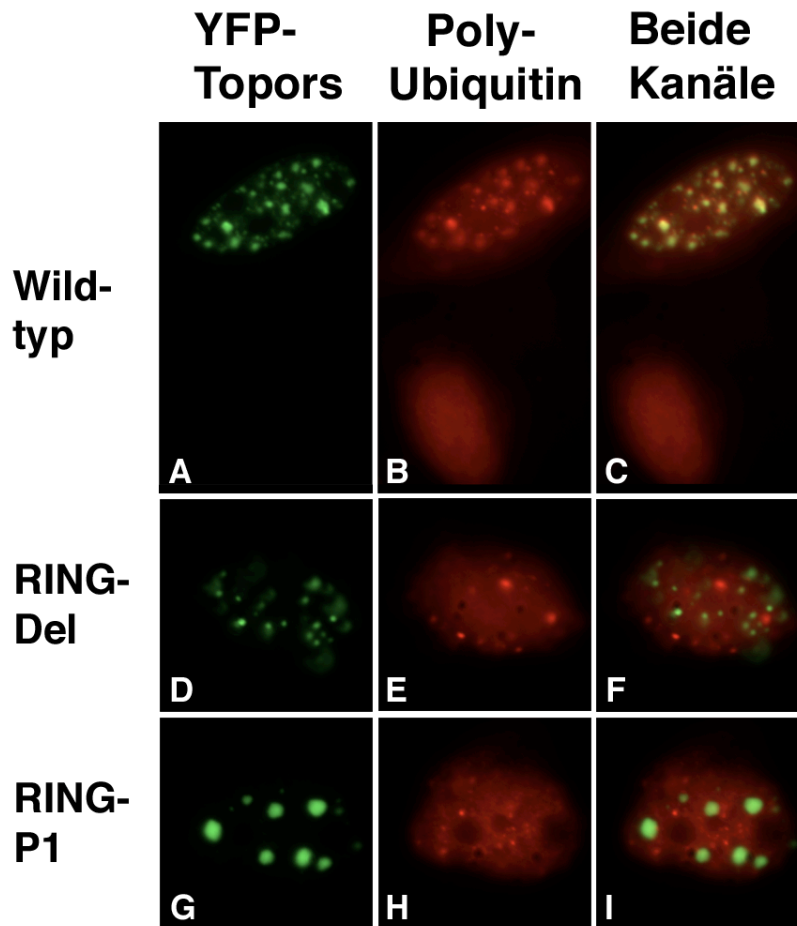
FEBS Lett. 2005 Sep; **579** (22), 5007-5012.

### 2.3.6.3 Abschließende Diskussion und weiterführende Ergebnisse

Topors erfüllt die verschiedenen Kriterien für eine SUMO-1 E3 Ligase. Es bindet sowohl an das SUMO-1 E2 konjugierende Enzym UBC9 als auch an SUMO-1 (306) (Abschnitt 2.3.5) und interagiert mit dem Substrat der SUMOlierung, p53 (307, 343). Es ist in der Lage, die SUMOlierung von p53 *in vitro* mit gereinigten Proteinkomponenten und *in vivo* nach Überexpression von SUMO-1 zu stimulieren. Eine SUMO-1 E3 Ligase Aktivität von Topors für p53 und weitere Proteine wie DJ1 und den Chromatin-assoziierten Faktor Sin3A konnte in der Zwischenzeit von anderen Gruppen bestätigt werden (230, 270). Obwohl Topors ein RING Finger Motiv enthält, ist dieses im Gegensatz zu den bei den PIAS Proteinen gemachten Beobachtungen für dessen SUMO-1 E3 Ligase Aktivität nicht erforderlich. Ausreichend sind vielmehr die im zentralen Teil des Proteins lokalisierten Aminosäuren 437 bis 555, die auch an der Bindung von SUMO-1 und p53 beteiligt sind. In Übereinstimmung mit der postulierten generellen Funktion von RING Finger Proteinen als E3 Ligasen (171) konnte jedoch neben der von uns beschriebenen SUMO-1 E3 Ligase Aktivität von der Arbeitsgruppe um Eric Rubin auch eine RING Finger abhängige Ubiquitin E3 Ligase-Aktivität von Topors für p53 nachgewiesen werden (236). Die Topors vermittelte Polyubiquitinierung von p53 war jedoch im Vergleich zur Ubiquitin E3 Ligase Aktivität von Mdm2, dem hauptsächlichen zellulären Regulator der p53 Konzentration (189), nur schwach ausgeprägt. Dies wirft die Frage auf, ob p53 das physiologische Substrat für die Ubiquitin E3 Ligase Aktivität von Topors darstellt. Für das *Drosophila* Homologe des humanen Topors, dTopors, konnte ebenfalls eine Ubiquitin E3 Ligase Aktivität nachgewiesen werden, jedoch nicht für das p53 Homologe Dmp53, sondern nur für das *Hairy* bHLH Repressorprotein (264). Die Interaktion zwischen Topors und p53 dagegen ist in *Drosophila* konserviert. Auch wir konnten deutliche Hinweise auf eine RING-Finger abhängige Ubiquitin E3 Ligase Aktivität von Topors erhalten. So kam es nach Expression des Topors Wildtyp-Proteins zu einer starken Akkumulation und Kollokalisierung von Polyubiquitin (Abb. 5). Nach Expression von Topors Proteinen mit einer Deletion des gesamten RING Finger Motivs (Aminosäuren 101 bis 143) bzw. RING-Finger-Punktmutanten war eine solche Akkumulation hingegen nicht zu beobachten. Topors besitzt damit als erstes bisher beschriebenes Protein sowohl eine RING Finger abhängige Ubiquitin E3 Ligase Aktivität als auch eine RING-Finger unabhängige SUMO-1 E3 Ligase Aktivität.

Zu den funktionellen Auswirkungen dieser Aktivitäten auf zelluläre Prozesse und dabei insbesondere auf die p53 Konzentration und Aktivität ergibt sich bisher ein nur unvollständiges und teilweise auch in sich widersprüchliches Gesamtbild. Verschiedene Befunde weisen eine Funktion von Topors als p53 abhängiger Tumorsuppressor hin. So wurde eine stark verminderte Konzentration der Topors-mRNA und des Topors-Proteins in Adenokarzinomen des Kolons im Vergleich zu gesundem Kolongewebe beobachtet (249) und auch bei der Progression von kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCLC) und der Bildung vom

Metastasen kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Abundanz der Topors mRNA (218).



*Abbildung 5: Topors-vermittelte Induktion der Akkumulation von kolokalisierendem Polyubiquitin. HeLa Zellen wurden mit verschiedenen GFP-Topors Konstrukten transfiziert, deren Lokalisation anhand ihrer Autofluoreszenz verfolgt werden kann. Polyubiquitin wurde mittels Immunfluoreszenz (monoklonaler Antikörper FK2) nachgewiesen. Beim Wildtyp-Protein ist im unteren Teil eine typische nicht transfizierte Zelle dargestellt (A-C), die keine Akkumulationen von Polyubiquitin aufweist. Beim Topors RING-Del Konstrukt ist das gesamte RING Finger Motiv deletiert, bei RING-P1 sind die beiden letzten Cystein-Reste des Motivs zu Alanin punktmuiert. Für Topors-RING-Del (D-E) und RING-P1 (G-I) sind die wenigen, eher untypischen Zellen dargestellt, die zumindest geringe Akkumulationen von Polyubiquitin aufweisen, ohne dass diese jedoch mit Topors kolokalisieren.*

Das Topors-Gen wurde auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 kartiert (51), einem Locus, der einen Verlust der Heterozygotität (LOH) in 86% aller SCLCs aufweist (138). Nach Expression von GFP-Topors Fusionsproteinen zeigen HeLa Zellen eine stark verminderte Proliferation mit einem Arrest in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>Phase des Zellzyklus (249). Dieser Effekt ist unabhängig von der Topors Ubiquitin E3 Ligase Aktivität, da er auf die Region zwischen den



Topors Aminosäuren 540 bis 704 eingegrenzt werden konnte. Diese stimmt weitgehend mit einer der beiden p53 bindenden Domänen von Topors überein (307, 343). Die Überexpression von murinem Topors, welches 86% identisch ist mit dem humanen Gegenstück, führt zu einer Stabilisierung von p53, einer Erhöhung der p53-abhängigen Transkription der p21<sup>Waf1</sup>, MDM2 und *bax* Promotoren, und resultiert ebenfalls in einer Inhibition des Zellwachstum durch G1-Arrest und Induktion der Apoptose (167). Im teilweisen Widerspruch dazu scheint die RING-Finger abhängige Ubiquitin E3 Ligase Aktivität von Topors für p53 zu stehen, die Proteasom-abhängig zu einer verminderten Konzentration von p53 führt (236). Wie bereits angemerkt, ist jedoch die Ubiquitin E3 Ligase Aktivität von Topors für p53 im Vergleich zu der des Mdm2 Proteins relativ schwach ausgeprägt. Auch führt die Ubiquitinierung von p53 nicht zwangsläufig zu dessen Degradation im 26S Proteasom. Nur die Mdm2 vermittelte Poly-Ubiquitinierung dient als Degradationssignal (165), während die Mono-Ubiquitinierung über die Dissoziation von Mdm2 unter Exposition eines Carboxy-terminalen Nukleären Exportsignals (NES) (31) die Relokalisation von p53 in das Zytoplasma induziert, möglicherweise eine Voraussetzung für die pro-apoptotischen Effekte von p53 (293). Bei der initialen Charakterisierung von p53 als SUMO-1 Zielstruktur wurde eine leichte Erhöhung der transkriptionellen Aktivität durch die SUMOlierung beobachtet (83, 244). Dieser Befund und auch die kurz darauf beschriebene SUMO-1 vermittelte Zunahme der p53-abhängigen Apoptose (197) sind jedoch immer noch Gegenstand der Diskussion, da sie in späteren Studien nicht bestätigt werden konnten (153). Auch die von uns beobachtete Zunahme der transkriptionellen Aktivität von endogenem p53 nach Überexpression der zentralen Topors Domäne spricht nicht unbedingt für einen direkten positiven Effekt der SUMOlierung auf die p53 Aktivität. Während schon bei kleinen Topors Konzentrationen eine weitgehende Sättigung der Zunahme der p53 Konzentration und SUMOlierung zu beobachten war, erfolgte der höchste Anstieg der p53-abhängigen Transkription erst bei höheren Topors Konzentrationen. Dieser Anstieg ist also möglicherweise auf die Topors-vermittelte SUMOlierung anderer zellulärer Faktoren zurückzuführen, welche dann indirekt die p53 Aktivität erhöhen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde von Shinbo et al. sogar eine leichte Repression der p53 Aktivität nach Expression des Volllänge Topors-Proteins beobachtet, die mit der SUMOlierung von p53 korrelierte (270). Auch verschiedene Mitglieder der PIAS Familie, die ebenfalls SUMO-1 E3 Ligase Aktivität für p53 besitzen, inhibieren die transkriptionelle Aktivität von p53 (208, 260), stimulieren jedoch die p53-abhängige Apoptose (20). Neuere Untersuchungen zur Funktion der Ubiquitinierung und SUMOlierung von p53 weisen darauf hin, dass es wahrscheinlich zu komplexen Interaktionen zwischen den beiden Modifikationen unter Beteiligung weiterer Faktoren kommt. So verläuft der bereits beschriebene Export von p53 aus dem Nukleus nach Mono-Ubiquitinierung über die Ubiquitin-abhängige Rekrutierung von SUMO-1 E3 Ligasen wie PIAS $\gamma$ , die im Zusammenspiel mit Mdm2 zu einer SUMOlierung des bereits ubiquitinierten p53 und damit zu einer Dissoziation von Mdm2 und der Exposition des NES führen (31). Über einen

analogen Mechanismus könnte Topors, welches im Gegensatz zu den PIAS Proteinen auch noch Ubiquitin E3 Ligase Aktivität besitzt, zu einem erhöhten Export und damit zu einer erhöhten apoptotischen Aktivität von p53 führen.

### **2.3.7 Poly-SUMOlierung der DNA Topoisomerase I durch Topors**

#### ***Originalarbeit***

Eva Hammer, Regine Heilbronn, und **Stefan Weger**

The E3 ligase Topors induces the accumulation of polysumoylated forms of DNA Topoisomerase I in vitro and in vivo

FEBS Lett. 2007, zur Veröffentlichung angenommen am 22.10.2007, in elektronischer Form veröffentlicht am 30.10.2007.

#### **2.3.7.1 Einführung**

Das mit den großen AAV Rep Proteinen Rep78 und Rep68 interagierende Protein Topors wurde ursprünglich als „Two-Hybrid“-Interaktionspartner der DNA Topoisomerase I (TOP1) identifiziert (87). Topors interagiert dabei mit der für die katalytische Aktivität des Enzyms in vitro nicht erforderlichen Amino-terminalen Domäne der TOP1. Diese enthält insgesamt fünf Kernwanderungssignale (2, 192) und spielt eine kritische Rolle bei der subzellulären Verteilung der TOP1. Die TOP1 ist ein nukleäres Enzym mit einer starken Anreicherung in den Nukleoli (50, 196, 336). Andere Protein-Protein Interaktionen der TOP1 werden ebenfalls über ihre Amino-terminale Domäne vermittelt, so beispielsweise die Assoziation mit dem RNA Polymerase I Holoenzym im Nukleolus (50, 89), mit Nukleolin (19), oder mit dem Spleißing-Faktor SF2/AS (156). Die Amino-terminale Domäne ist aber für die Anreicherung der TOP1 in den Nukleoli nicht absolut erforderlich. Vielmehr scheint die Verteilung der TOP1 zwischen den Nukleoli und dem Nukleoplasma ein dynamischer Prozess zu sein und die Anreicherung in den Nukleoli resultiert sowohl aus Protein-Protein Interaktionen als auch aus der Assoziation der TOP1 mit der rDNA während deren Replikation und Transkription (50). Die Mobilität der TOP1 im Nukleolus ist dadurch geringer als die im Nukleoplasma (49).

Die TOP1 katalysiert die Relaxation von Torsionsspannung in der DNA, die mit verschiedenen molekularen Prozessen wie der Replikation der DNA, Rekombination, der Transkription der verschiedenen Klassen von RNAs und auch der Chromatinkondensation einhergeht (37) (Abb. 6). Das Enzym setzt einen Einzelstrangbruch in der DNA unter Ausbildung einer kovalenten Phosphotyrosin-Bindung zwischen dem Tyrosinrest an Aminosäureposition 723 der TOP1 und dem 3'-Ende der genickten DNA. Die kontrollierte Rotation der Region stromabwärts des Einzelstrangbruchs unter Passage des intakten Stranges durch den Einzelstrangbruch führt dann zur Relaxation, gefolgt von der Religation des Einzelstrangbruchs (164). Die TOP1 ist das ausschließliche zelluläre Angriffsziel für das

Zytostatikum Camptothecin (CPT) und davon abgeleitete Derivate. Diese binden an die kovalenten TOP1-DNA-Komplexe und verlangsamen bzw. verhindern den Religationsschritt (226). Dies führt zu einer Blockade der Transkriptionselongation (227) und nach Kollision mit fortschreitenden Replikationsgabeln (276) zu Doppelstrangbrüchen und schließlich zu einer erhöhten Apoptose-Rate.

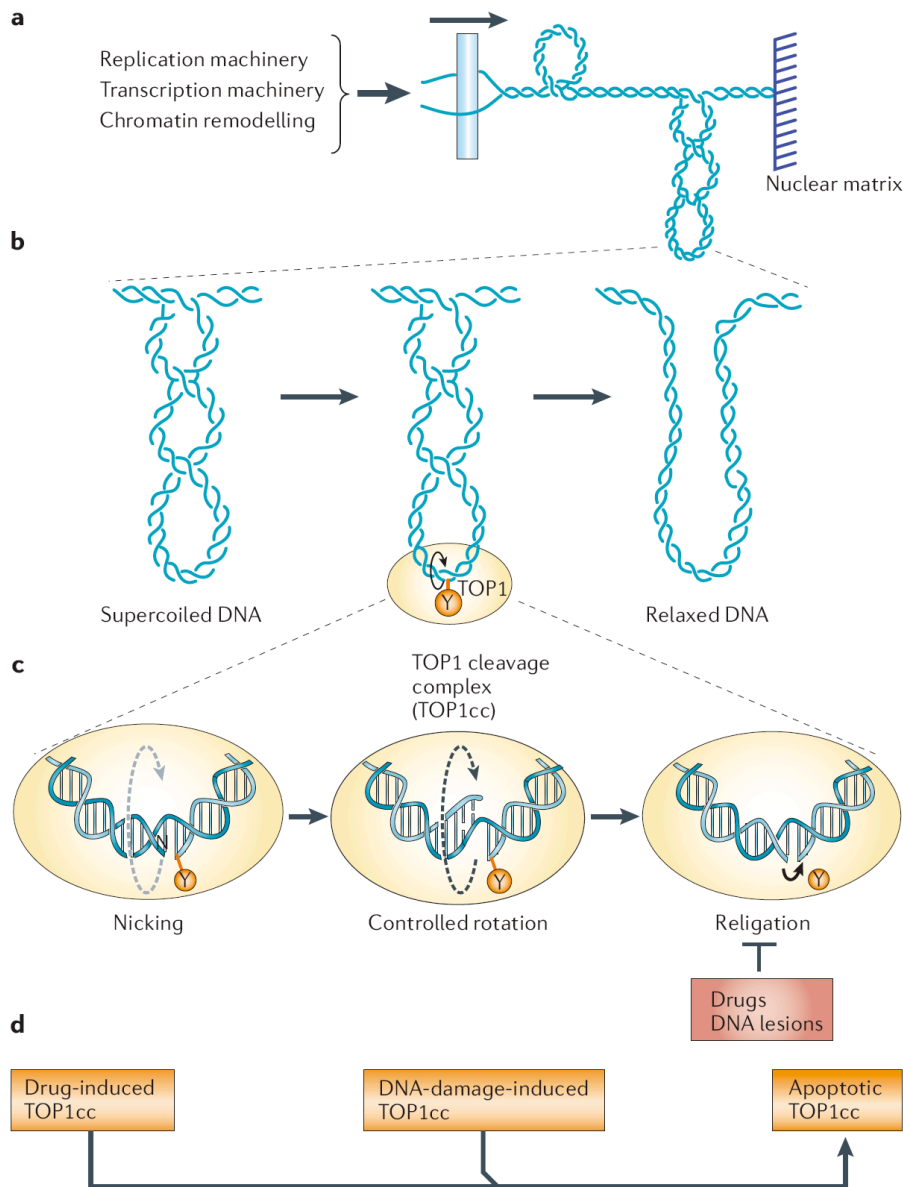


Abbildung 6: (a-c) Mechanismus der Relaxation von Torsionsspannung in der DNA durch die TOP1. (c-d) Stabilisierung der kovalenten TOP1-DNA-Komplexe durch Zytostatika (CPT), DNA-Schäden und während der Apoptose. Aus: Pommier, Y. *Nature Reviews Cancer*, Volume 6 October 2006, 789 - 802.

CPT induziert eine schnell verlaufende Hyper-SUMOlierung der TOP1 mit mehreren SUMO-1 Molekülen, sowohl in Hefe- als auch in Säugerzellen (176). Die vorrangige Akzeptorstelle am Lysinrest 117 und zwei weitere untergeordnete Akzeptorstellen an den Lysinresten 103 und 153 sind im Amino-Terminus des Enzyms lokalisiert (237). Während die Hypersensitivität von UB9 Hefemutanten gegenüber CPT zunächst auf eine Beteiligung der SUMOlierung an der Reparatur der TOP1-induzierten DNA-Schäden deutete (176), wurden in späteren Untersuchungen keine Unterschiede in der Degradation von SUMOlierungs-negativen TOP1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein gefunden (237).

Ein eher gegenteiliger Befund ist auch die nach verstärkter TOP1-Sumolierung beobachtete Zunahme der kovalenten TOP1-DNA Intermediate und die erhöhte Apoptoserate (116). In Übereinstimmung mit den letzteren Befunden scheint die Zunahme der CPT-Sensitivität bei gleichzeitiger Abnahme der TOP1-Aktivität nach Überexpression einer dominant-negativen UB9 Mutante auf die verminderte SUMOlierung anderer zellulärer Proteine wie beispielsweise Daxx und nicht auf die reduzierte SUMOlierung der TOP1 zurückzuführen sein. Welche zellulären Faktoren die CPT-induzierte Hyper-SUMOlierung der TOP1 vermitteln, war bislang ungeklärt. Da wir bereits eine Funktion von Topors als SUMO-1 E3 Ligase für p53 nachweisen konnten (siehe Abschnitt 2.3.6) und Topors mit dem Amino-Terminus der TOP1, welcher die SUMOlierungs-Akzeptor-Stellen enthält, interagiert, lag es nahe, eine mögliche SUMO-1 E3 Ligase Aktivität von Topors für die TOP1 zu untersuchen. In der nachfolgenden Originalarbeit konnte gezeigt werden, dass Topors in einem rekonstituierten *in vitro* System bevorzugt die Bildung hochmolekularer TOP1-SUMO-1 Konjugate mit mehreren SUMO-1 Molekülen induziert. Experimente mit TOP1-Punktmutanten und mit methyliertem SUMO-1 zeigen, dass es sich bei diesen hochmolekularen Konjugaten um SUMO-1 Ketten an einer limitierten Zahl von Lysin-Akzeptor-Stellen handelt. In humanen Osteosarcoma-Zellen konnten hochmolekulare TOP1-SUMO-1 Konjugate durch die Überexpression von Topors induziert werden, wobei es sich auch dabei zumindest partiell um TOP1 assoziierte SUMO-1 Ketten handelt.

***Originalarbeit***

Eva Hammer, Regine Heilbronn, und **Stefan Weger**

The E3 ligase Topors induces the accumulation of polysumoylated forms of DNA Topoisomerase I in vitro and in vivo

FEBS Lett. 2007 Nov; **581** (28), 5418-5424.

### 2.3.7.3 Abschließende Diskussion

Durch DNA Topoisomerasen vermittelte Schädigungen der zellulären DNA werden durch eine Reihe von Antibiotika, Zytostatika, Toxinen, Karzinogenen sowie durch physiologischen Stress induziert (42, 166, 169, 210, 226, 299). CPT inhibiert die DNA Topoisomerase I (TOP1) durch Stabilisierung der kovalenten Intermediate zwischen dem Enzym und dem 3'-Ende der genickten DNA (117, 118). Dabei bildet CPT mit der TOP1 und der DNA einen ternären Komplex aus (105, 106), der nicht in der Lage ist, den Religationsschritt zu katalysieren (281). CPT induzierte, TOP1 vermittelte DNA-Schäden führen zur Aktivierung der Ubiquitin-abhängigen Degradation der TOP1 im Proteasom (60). Dieser Abbau kann als spezifischer Reparaturmechanismus für diese Art von DNA-Schäden angesehen werden, da die erniedrigte TOP1-Konzentration mit einer erhöhten Resistenz von Tumorzellen gegenüber CPT verbunden ist (60). Die Degradation der TOP1 ist Transkriptions-abhängig (61) und eines der an diesem Prozess beteiligten Enzyme ist wahrscheinlich die Ubiquitin E3 Ligase Cullin 3 (337).

Nach CPT Gabe erfolgt eine schnelle Modifikation der TOP1 mit mehreren SUMO-1 Resten. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass das mit der TOP1 interagierende Protein Topors sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Bildung hochmolekularer TOP1-SUMO-1 Konjugate katalysiert. Dabei kommt es ganz überwiegend zur Bildung von SUMO-1 Seitenketten an bereits mit SUMO-1 modifizierten Lysinresten, während die Anzahl der modifizierten Lysinreste nicht oder nur sehr geringfügig erhöht wird. Für eine solche Aktivität wurde in dem analogen Ubiquitin-modifizierenden System der Begriff der E4 Ligase geprägt (115, 145). Im Gegensatz zur Situation bei den eng verwandten SUMO-2 und SUMO-3 Polypeptiden (284) war die Existenz von polymeren SUMO-1 Seitenketten lange Zeit umstritten, da dem SUMO-1 Polypeptid die den SUMO-2/SUMO-3 Verzweigungspunkten entsprechende Lysin-Akzeptorstellen im Amino-Terminus fehlt. Eine solche Poly-SUMOlierung mit SUMO-1 konnte jedoch bereits für eine Reihe von Substraten *in vitro* nachgewiesen werden (82), insbesondere auch für ein Fusionsprotein bestehend aus der GST (Glutathion-S-Transferase) und einem eng begrenzten Bereich der TOP1, der nur die hauptsächliche Lysin-Akzeptor-Stelle an Aminosäureposition 117 enthält (329). Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Topors ausschließlich die Poly-SUMOlierung, nicht aber die initiale Mono-SUMOlierung an den drei charakterisierten Lysin-Akzeptorstellen im Amino-Terminus der TOP1 katalysiert. Bisher ist nicht bekannt, welche anderen beschriebenen SUMO-1 E3 Ligasen wie beispielsweise die PIAS Protein Familie (111) an der SUMOlierung der TOP1 beteiligt sind. Auch über die Funktion der TOP1-SUMOlierung gibt es widersprüchliche Erkenntnisse. So beobachtet man nach CPT Behandlung nicht nur eine Hyper-SUMOlierung der TOP1, sondern auch eine schnelle Relokalisation der TOP1 aus den Nukleoli in das Nukleoplasma. Die enge Korrelation und die vergleichbare Kinetik dieser beiden Prozesse (193) deuten auf deren kausale Verknüpfung hin. Lokalisations-Experimente

mit SUMOlierungs-negativen TOP1 Punktmutanten schienen diese Hypothese zunächst zu bestätigen, da diese Punktmutanten eine starke Akkumulation in den Nukleoli und eine stark verminderte Relokalisation in das Nukleoplasma nach CPT Gabe zeigten (237). Dieser Befund wird jedoch noch kontrovers diskutiert, da er in neueren Arbeiten, die mit den gleichen Punktmutanten in lebenden Zellen durchgeführt wurden, nicht bestätigt werden konnte (50). In letzteren Untersuchungen wurde weiterhin gezeigt, dass die gesamte Amino-terminale Domäne der TOP1 mit den SUMO-1 Akzeptorstellen für die CPT induzierte Relokalisation entbehrlich, das katalytische Zentrum mit dem Tyrosin-Rest an Aminosäureposition 723 hingegen absolut erforderlich ist. Die Autoren dieser Studie führen daher die Akkumulation der TOP1 im Nukleoplasma ausschließlich auf die bevorzugte Immobilisierung des Enzyms auf der nukleoplasmatischen DNA und die dadurch bedingte Verringerung seiner Mobilität zurück (50). Ein allgemeiner Konsens scheint jedoch dahingehend zu bestehen, dass die SUMOlierung des Enzyms überwiegend an dem mit DNA assoziierten Anteil stattfindet (50, 116, 176). Da die katalytisch inaktive Mutante mit der Mutation des Tyrosinrestes 723 bereits unabhängig von der Behandlung mit CPT stark SUMOliert werden kann, ist die Ausbildung kovalenter TOP1-DNA Komplexe für die Modifikation nicht erforderlich (116). Die bevorzugte SUMOlierung von DNA-assoziiertes TOP1 weist darauf hin, dass es sich bei dieser Modifikation um ein sehr frühes Ereignis bei der Reparatur der Protein-gebundenen DNA Läsionen handelt. Bis vor kurzem galt die generelle Annahme, dass die SUMOlierung im Gegensatz zur Polyubiquitinierung nicht in die Proteasom-abhängige Proteindegradation mündet. In einigen beschriebenen Fällen führt sie durch Konkurrenz mit der Ubiquitinierung um den zu modifizierenden Lysinrest sogar zur Stabilisierung des Zielproteins, so etwa für den zytoplasmatischen Inhibitor I $\kappa$ B des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (63). Die obige Annahme musste jedoch durch die in jüngster Zeit erschienenen Studien verschiedener Arbeitsgruppen revidiert werden. Darin wurden in Hefen und Säugerzellen eine Reihe von homologen Proteinen bzw. Proteinkomplexen beschrieben, die als Ubiquitin E3 Ligasen spezifisch die Ubiquitinierung und damit die Degradation von bereits mit SUMO modifizierten Proteinen katalysieren (229, 280, 291, 324). Diese Proteine bzw. Proteinkomplexe wurden als STUbLs (**S**UMO-**T**argeted **U**biquitin **L**igase) oder ULSs (**U**biquitin **L**igases for **S**UMO conjugates) bezeichnet. Sie enthalten sowohl SUMO-1 interagierende Proteindomänen, so genannte SIMs (**S**UMO interacting motifs) als auch das für eine Klasse von Ubiquitin E3 Ligasen charakteristische RING Finger Motiv. In den bisher in Hefen identifizierten STUbLs sind diese Funktionen auf zwei Polypeptide eines Proteinkomplexes verteilt, während der bisher einzige charakterisierte Vertreter in höheren Eukaryoten, das RNF4 (RING-finger protein 4), beide Funktionen auf einem relativ kleinen Protein von 190 Aminosäuren vereinigt. Möglicherweise wird die SUMO-1 abhängige, Ubiquitin-vermittelte Proteolyse insbesondere durch die Bildung von SUMO-Seitenketten induziert (291). Ein von Prudden et al. entwickeltes Modell zur Wirkungsweise der STUbLs geht davon aus, dass die SUMOlierung des Zielproteins nicht

unmittelbar zu seiner Ubiquitin-vermittelte Degradation führen muss, sondern dass die STUbL-abhängige Inaktivierung eine spezifische Funktion der SUMOlierten Form des Proteins erst dann außer Kraft setzt, wenn diese nicht mehr benötigt wird (229). Wie die von Horie et al. mit der katalytisch inaktiven TOP1 Y723F Mutante durchgeführten Experimente zeigen, könnte für die TOP1 eine Funktion der SUMOlierung darin bestehen, die Rekrutierung zusätzlicher TOP1 Moleküle an die DNA zu induzieren (116). Eine solche Rekrutierung wäre erforderlich, wenn die katalytische Aktivität der vorhandenen TOP1 Moleküle unter physiologischen Bedingungen nicht mehr ausreicht, würde aber im Falle einer generellen Blockierung dieser katalytischen Aktivität sogar zu einer Zunahme der TOP1-assoziierten DNA-Schäden führen. Dieses Modell liefert eine gute Erklärung für die beobachtete Zunahme der CPT induzierten kovalenten TOP1-DNA Komplexe und die damit verbundene erhöhte Apoptose-Rate nach SUMO Überexpression (116). Im Rahmen dieses Modells kann die SUMOlierung, auch wenn sie am Ende über die Aktivität der STUbLs in den Proteasom-vermittelten Proteinabbau mündet, die beobachtete Halbwertszeit des SUMO-1 modifizierten Proteins zunächst erhöhen. Interessanterweise enthält Topors wie das RNF4 sowohl SIMs als auch ein RING Finger Motiv. Eine Bindung des Carboxy-Terminus von Topors an SUMO-1 unter Beteiligung der Aminosäuren 911 bis 917 konnte von uns bereits bei der initialen Charakterisierung von Topors als Substrat für die SUMO-1 Modifikation nachgewiesen werden (306) (Abschnitt 2.3.5). Diese SUMO-1 bindende Domäne von Topors wurde neben den SUMO bindenden Domänen einer Reihe von anderen Proteinen von Hecker et al. für Untersuchungen zur Definition eines generellen SIMs herangezogen (92). Die daraus abgeleitete Konsensus-Sequenz enthält eine hydrophobe Kernsequenz mit 3 bis 4 hydrophoben Aminosäuren (Isoleucin, Leucin oder Valin) und einem sauren oder polaren Aminosäurerest an Position 2 oder 3. Die um diese Kernbindungssequenz angeordneten Aminosäuren sind unstrukturiert und enthalten einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren, wobei diese sowohl Amino-terminal als auch Carboxy-terminal zur Kernsequenz lokalisiert sein können. Neben dem bereits gut charakterisierten SIM mit der hydrophoben Kernsequenz zwischen den Aminosäuren 907 und 910 und dem sauren/polaren Bereich zwischen den Aminosäuren 911 und 917 enthält der Topors Carboxy-Terminus ähnlich wie RNF4 eng benachbart ein zweites potentiell SIM. Dessen Kernsequenz liegt zwischen den Aminosäuren 952 bis 956 und ist ebenfalls eingebettet in einen Bereich mit einer Reihe von sauren Aminosäuren. Verschiedene Befunde weisen ferner darauf hin, dass Topors bevorzugt an die SUMOlierte Form von Proteinen bindet. So vermittelt die Carboxy-terminale Domäne von Topors, die für die Bindung an SUMO-1 erforderlich ist, auch die Bindung an p53. Die zweite unabhängige p53 Bindungsdomäne im zentralen Teil des Topors Proteins (343) ist ebenfalls in der Lage, SUMO-1 zu binden. Topors bindet an den Amino-Terminus der TOP1, der die drei Lysin-Akzeptorstellen enthält (87). Untersuchungen zu einer weiteren Eingrenzung der für die Bindung an Topors erforderlichen p53 und TOP1 Domänen mit besonderem Augenmerk auf SUMOlierungs-negative Punktmutanten sind daher für die nahe Zukunft geplant. Auch die Bindung von Topors an den Transkriptionsfaktor TRPS1 wird über



die Carboxy-terminale Topors Domäne vermittelt (130). Punktmutationen oder Deletionen von TRPS1 verursachen die Trichorhinophalangealen (TRP) Syndrome und in Zusammenarbeit mit Frank Kaiser vom Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Essen konnten wir zeigen, dass die Eigenschaften von TRPS1 als transkriptioneller Repressor über die SUMOlierung von zwei Lysinresten im Carboxy-Terminus des Proteins reguliert werden (131). Der Carboxy-Terminus von TRSP1 wiederum ist auch für die Bindung an den Carboxy-Terminus von Topors erforderlich. Aus den dargestellten Befunden leitet sich als eine mögliche Arbeitshypothese die SUMOlierungs-abhängige Bindung von Topors an eine Reihe von zellulären und möglicherweise auch viralen Proteinen wie den AAV Rep Proteinen und eine damit verbundene duale Funktion als SUMO-1 E3 (oder auch E4) und Ubiquitin E3 Ligase ab. Über eine differentielle Modifikation der Zielproteine mit SUMO-1 und Ubiquitin könnte Topors so entscheidend an der Regulation der Funktion und Stabilität dieser Zielproteine beteiligt sein. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass es sich bei Topors um ein Chromatin-assoziiertes Protein handelt. So sind viele der in einem „proteomischen Screen“ identifizierten möglichen Zielproteine für die Topors SUMO-1 E3 Ligase Aktivität an Chromatin-modifizierenden Prozessen beteiligt (230). Das *Drosophila* Homologe des humanen Topors (dTopors) ist für die Funktion des *gypsy* Insulatorelements erforderlich und induziert die Bildung der so genannten Nukleären Insulator Bodies, die mit Chromatin und mit der Nukleären Lamina in *D. melanogaster* assoziiert sind.

## 2.3.8 Funktionelle Interaktion der großen Rep Proteine mit dem zytoplasmatischen Protein KCTD5

### *Originalarbeit:*

**Stefan Weger**, Eva Hammer, Anne Götz und Regine Heilbronn

Identification of a cytoplasmic interaction partner of the large regulatory proteins Rep78/Rep68 of adeno-associated virus type 2 (AAV-2).

Virology. 2007 Mai; **362** (1) , 192-206.

### 2.3.8.1 Einführung

Zusätzlich zu verschiedenen cDNA Bibliotheken aus HeLa Zellen wurde auch eine Bibliothek aus 293 Zellen, einer mit den adenoviralen E1A/E1B Genprodukten transformierten humanen embryonalen Nierenzelllinie (84), mit Hilfe des Hefe „Two-Hybrid“-Systems auf mögliche Rep Interaktionspartner „gescreent“. In dieser Bibliothek wurden neben einer Reihe von Klonen, welche in Übereinstimmung mit den bereits dargestellten Ergebnissen in HeLa Zellen entweder für PC4 oder für die isolierte Einzelstrang-DNA bindende Domäne (ssDBD) von PC4 kodierten, insgesamt 11 weitere Klone mit untereinander identischen Restriktionsmustern identifiziert. Drei dieser Klone mit einem Insert von jeweils ca. 2.5 kb wurden sequenziert und waren identisch bis auf geringe Längenunterschiede im Amino-terminalen Bereich der cDNA. Sie enthielten in ihrem N-Terminus einen offenen Leserahmen von 234 Aminosäuren. Analoge Sequenzen waren als EST (expressed sequence tags) in verschiedenen Datenbanken bereits veröffentlicht worden. Über die Funktion des Gens war jedoch bislang nichts bekannt. Der Amino-terminale Teil des offenen Leserahmens von Aminosäureposition 50 bis 140 enthält Homologien zu einer Tetramerisierungsdomäne von K<sup>+</sup>-Kanal bildenden Proteinen, weshalb dieses Protein auch als KCTD5 für „potassium channel tetramerisation domain containing 5“ bezeichnet wird. Die Homologien zu den K<sup>+</sup>-Kanal bildenden Proteinen beschränken sich jedoch ausschließlich auf diesen Bereich. Diese Tetramerisierungsdomäne weist auch Homologien zur BTB/POZ Domäne auf, die als Protein-Interaktionsdomäne von verschiedenen Transkriptionsfaktoren fungieren kann. Während die großen AAV Rep Proteine praktisch ausschließlich im Nukleus lokalisiert sind, ist KCTD5 in Abwesenheit von Rep Protein Expression überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Nach Rep Expression kommt es zu einer Akkumulation von KCTD5 im Nukleus. Eine nukleäre Lokalisation der Rep Proteine ist jedoch für die Interaktion mit KCTD5 nicht erforderlich, ein starkes Indiz für eine zumindest transiente Interaktion von Rep und KCTD5 im Zytoplasma. Auch funktionell kann KCTD5 mit den Rep Proteinen im Zytoplasma interferieren, da es in der Lage ist, die posttranskriptionellen Effekte des Rep68 Proteins zu inhibieren.

**Stefan Weger**, Eva Hammer, Anne Götz und Regine Heilbronn

Identification of a cytoplasmic interaction partner of the large regulatory proteins Rep78/Rep68 of adeno-associated virus type 2 (AAV-2).

Virology. 2007 Mai; **362** (1), 192-206.

### 2.3.8.3 Abschließende Diskussion

Mit KCTD5 konnte erstmals ein Interaktionspartner der AAV Rep Proteine identifiziert werden, der überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist. Interessanterweise kommt es in Gegenwart der großen Rep Proteine jedoch zu einer Translokation von KCTD5 in den Nukleus. Für eine solche Translokation gibt es verschiedene mögliche Erklärungsmodelle. So könnte es zunächst zu einer Assoziation von Rep und KCTD5 im Zytoplasma kommen und anschließend zum Transport des gebildeten Proteinkomplexes über das Kernwanderungssignal (NLS) der großen Rep Proteine in den Nukleus. Dieses Modell wird unterstützt durch die stabile Interaktion von KCTD5 mit Rep-NLS-Mutanten, die eine stark reduzierte Kernlokalisation im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinen aufweisen. Ferner konnten Cassell et al zeigen (32), dass die auch in dieser Studie verwendeten Rep-NLS Mutanten nach Koexpression der Wildtyp Rep Proteinen ebenfalls in den Nukleus transloziert werden können, was für ein „Shuttling“ der Wildtyp-Rep Proteine zwischen Nukleus und Zytoplasma spricht. Einige unserer Beobachtungen sprechen jedoch auch für eine Rep-vermittelte Retention von KCTD5 im Nukleus. So sollte KCTD5 auf Grund seiner Größe von 28 kDa frei durch die Kernporen diffundieren können, akkumuliert jedoch im Zytoplasma, was auf ein Nukleäres Export Signals (NES) hinweist. Eine KCTD5-Mutante mit einer Deletion der 31 Carboxy-terminalen Aminosäuren ist praktisch ausschließlich im Nukleus lokalisiert und diese Aminosäuren sind auch erforderlich für die Interaktion mit den großen Rep Proteinen. Möglicherweise inhibieren die Rep Proteine daher über die Maskierung eines im Carboxy-Terminus lokalisierten NES den Export von KCTD5 in das Zytoplasma. Natürlich können sich die beiden dargestellten möglichen Mechanismen in ihrer Wirkung auch ergänzen.

Die Carboxy-terminale KCTD5 Mutante (KCTD5-C2) ist ein geeignetes Werkzeug, um mögliche funktionelle Auswirkungen der Translokation von KCTD5 in den Zellkern zu untersuchen und damit Aufschlüsse über die physiologische Rolle von KCTD5 und eine eventuelle Funktion im AAV Lebenszyklus zu erhalten. Während die Überexpression von KCTD5 keinen Einfluss auf die produktive AAV Infektion in Gegenwart von Adenovirus hat, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es eine Rolle bei der Rep-vermittelten Inhibition der AAV Genexpression in Abwesenheit von Helfervirus spielt. Auch eine mögliche Beteiligung von KCTD5 an den pleiotropen Effekten der AAV Rep Proteine soll in naher Zukunft mit Hilfe der KCTD5-C2 Mutante und KCTD5-„Knock-Out“-Ansätzen untersucht werden. Kürzlich wurde ein zu KCTD5 homologes Protein beschrieben, welches ebenfalls diese Tetramerisierungsdomäne enthält und als KCTD10 bezeichnet wird (342). Für dieses Protein konnte gezeigt werden, dass es mit PCNA und der DNA Polymerase  $\delta$  interagieren kann. Diese zwei Faktoren sind interessanterweise auch an der AAV DNA Replikation beteiligt. Während die Tetramerisierungsdomäne in KCTD5 für die Bindung der großen Rep Proteine nicht ausreichend ist, so ist sie doch an dieser entscheidend beteiligt. Daher ist eine

Interaktion zwischen den Rep Proteinen und KCTD10 nicht auszuschließen und soll ebenfalls Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

### 3 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Identifizierung und Charakterisierung von zellulären Zielstrukturen der regulatorischen (Rep) Proteine des Adeno-assoziierten Virus (AAV) ein verbessertes Verständnis des AAV Replikationszyklus und der pleiotropen Effekte der Rep Proteine zu erreichen. Diese pleiotropen Effekten beinhalten unter anderen die Rep vermittelte Inhibition viraler und zellulärer DNA Replikation, die Regulation homologer und heterologer Promotoren sowie die Inhibition der Zelltransformation durch virale und zelluläre Onkogene. Basierend auf den tumorsuppressiven Eigenschaften der Adeno-assoziierten Viren und der isolierten Rep Proteine sollten über diesen Ansatz insbesondere zelluläre Proteine mit möglichen onkogenen oder tumorsuppressiven Eigenschaften identifiziert und ihr Wirkungsmechanismus näher untersucht werden.

Eine initiale Mutationsanalyse der für die Beeinflussung verschiedener homologer und heterologer Promotoren erforderlichen Domänen der Rep Proteine sowie die Mutationsanalyse der für die Hemmung der HPV18 URR erforderlichen cis-aktiven Elemente lieferte deutliche Hinweise, dass an der Vermittlung der transkriptionellen Effekte der Rep Proteine mit Ausnahme des homologen AAV p5 Promotors die direkte Bindung der Rep Proteine an regulatorische DNA-Sequenzen nur in untergeordnetem Maße beteiligt ist. Vielmehr scheinen Protein-Protein Wechselwirkungen der Rep Proteine mit Komponenten des generellen Transkriptionskomplexes und/oder akzessorischen Faktoren eine entscheidende Rolle zu spielen.

Zur Identifizierung von zellulären Interaktionspartnern der Rep wurde ein Hefe-basiertes „Two-Hybrid“-System verwendet. In cDNA Bibliotheken aus nicht-infizierten HeLa und 293 Zellen konnten insgesamt vier Bindungspartner der großen Rep Proteine identifiziert werden, die anschließend einer umfassenden Charakterisierung unterzogen wurden. Im Einzelnen handelte es sich dabei um den transkriptionellen Koaktivator PC4, einen allgemeinen Mediator von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, um das Ubiquitin konjugierende Enzym 9 (UBC9), welches die SUMO-Modifikation von zellulären und viralen Proteinen vermittelt, um Topors, einen Two-hybrid-Interaktionspartner des Tumorsuppressorproteins p53 und der DNA Topoisomerase I, und um KCTD5, ein bisher nicht beschriebenes Protein unbekannter Funktion.

Der transkriptionelle Koaktivator PC4 verstärkt die Transkriptionsrate in Gegenwart einer ganzen Reihe unverwandter sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren. Diese Funktion von PC4 wird durch Protein-Protein-Wechselwirkungen seiner Amino-terminalen Domäne mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und unterschiedlichen Klassen von Aktivierungsdomänen vermittelt. Rep bindet jedoch an die Carboxy-terminale, Einzelstrang-DNA bindende Domäne (ssDBD) von PC4. Diese wirkt als starker transkriptioneller Repressor in Bereichen ungepaarter Doppelstrang-DNA, an DNA-Enden und an Einzelstrang-DNA, die antiparallele Stränge ausbilden kann. Über diese Funktion reprimiert PC4 die AAV

Genexpression in Abwesenheit von Helfervirus und bildet gemeinsame Komplexe mit den großen Rep Proteinen auf den Invertierten Terminalen Wiederholungen (ITRs) aus, den hauptsächlich regulatorischen Sequenzen von AAV. Daher ist PC4 im Zusammenspiel mit den Rep Proteinen möglicherweise ein wichtiger Faktor bei der Etablierung des latenten AAV-Zyklus.

In Übereinstimmung mit der beobachteten Interaktion der großen Rep Proteine mit dem SUMO-1 E2 konjugierenden Enzym UBC9 konnte eine SUMOlierung am Lysinrest an Aminosäureposition 84 des Rep78 Proteins nachgewiesen werden. Dieser Modifikation kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Rep78 Proteinstabilität zu. Bei einer produktiven AAV Infektion in Gegenwart von Helfervirus scheint die verminderte Stabilität einer SUMOlierungs-defizienten Rep78 Mutante jedoch kein begrenzender Faktor für den Infektionsverlauf und die Produktion neuer infektiöser Viren zu sein.

Im Gegensatz zu PC4 verstärkt das ebenfalls als Rep Interaktionspartner identifizierte, p53 und DNA Topoisomerase I bindende Protein Topors die AAV Genexpression in Abwesenheit von Helfervirus. Topors, für welches eine Reihe von Hinweisen auf mögliche tumorsuppressive Eigenschaften vorliegen, wurde in weiterführenden Untersuchungen nicht nur selbst als Zielprotein für die Modifikation mit mehreren SUMO-1 Resten identifiziert, sondern konnte auch als SUMO-1 E3 Ligase für p53 und die DNA Topoisomerase I (TOP1) *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Der SUMOlierungs-„Pathway“ ist in den letzten Jahren als ein wichtiger Regulationsmechanismus von molekularen Prozessen wie der Genexpression, dem Kerntransport, der Zellzyklusprogression, Signaltransduktionswegen und DNA-Reparaturprozessen erkannt worden. Ein funktionelles SUMOlierungs-System ist von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der genomischen und chromosomalen Stabilität. Während Topors die Monosumolierung von p53 an dessen hauptsächlichlicher Akzeptorstelle in der Carboxy-terminalen, regulatorischen Domäne verstärkt, katalysiert es im Falle der TOP1 überwiegend die Bildung von SUMO-1 Seitenketten an bereits monosumolierten Lysin-Resten. Topors ist das erste Protein, für welches sowohl Ubiquitin als auch SUMO-1 E3 Ligase Aktivität nachgewiesen werden konnte. Einige unsere Befunde weisen darauf hin, dass es präferentiell an SUMOlierte Proteine binden kann und über eine differentielle weitere SUMOlierung oder Ubiquitinierung die Funktion dieser Bindungspartner modulieren kann. Dieses Arbeitsmodell einer SUMO-1 abhängigen Ubiquitin E3 Ligase Aktivität von Topors wird gestützt durch die in der Literatur in jüngster Zeit beschriebene Charakterisierung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen mit analoger Funktion. Diese weisen zum Teil eine sehr ähnliche Anordnung von SUMO-Bindungs-Motiven und RING-Finger Motiven auf wie das Topors Protein. Auch die Assoziation von Topors mit den subnukleären POD Strukturen weist auf mögliche Funktionen bei der Regulation der Genexpression sowie DNA-Replikations- und Reparaturprozessen hin.

Schließlich konnten wir mit KCTD5 erstmals einen zytoplasmatischen Interaktionspartner der AAV Rep Proteine identifizieren, der in Gegenwart der großen Rep Proteine zu einem großen Anteil in den Kern transloziert wird. Eine weitere Charakterisierung dieses Proteins, welches

bisher in Datenbanken ausschließlich in Form von exprimierten mRNA-Sequenzen aus verschiedenen Tumorzelllinien beschrieben war, steht jedoch noch aus und wird Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.



## 4 Abkürzungsverzeichnis

<b>AAV</b>	Adeno-assoziiertes Virus
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>ATF</b>	activating transcription factor
<b>BPV</b>	Bovines Papillomvirus
<b>cAAP</b>	cellular AAV activating protein
<b>CAT</b>	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
<b>CDK</b>	cyclin-dependent kinases
<b>CPT</b>	Camptothecin
<b>CRE</b>	cyclic AMP responsive element
<b>CREB</b>	cyclic AMP responsive element binding protein
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor
<b>EST</b>	expressed sequence tags
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>HCMV</b>	Humanes Cytomegalievirus
<b>HIPK2</b>	homeodomain-interacting protein kinase 2
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz Virus
<b>HMG1</b>	high mobility group protein 1
<b>HPV16</b>	Humanes Papillomvirus Typ16
<b>HPV18</b>	Humanes Papillomvirus Typ18
<b>HSF1</b>	heat shock factor 1
<b>ITR</b>	inverted terminal repeat
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>KCTD5</b>	potassium channel tetramerisation domain containing 5
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>KKBP52</b>	52 kd FK506 binding protein
<b>LOH</b>	loss of heterozygosity
<b>LTR</b>	long terminal repeat
<b>MEF2</b>	myocyte enhancer factor 2
<b>MLTF</b>	major late transcription factor
<b>NES</b>	nuclear export signal
<b>NLS</b>	nuclear localization signal
<b>NRE</b>	negative regulatory region
<b>PC4</b>	positive cofactor 4
<b>PCNA</b>	proliferating cell nuclear antigen
<b>PDSM</b>	phosphorylation-dependent sumoylation motif
<b>PIAS</b>	protein inhibitors of activated STAT

<b>PKA</b>	Protein Kinase A
<b>PKRX</b>	X-chromosomal kodierte Protein Kinase
<b>PML</b>	promyelocytic leukemia protein
<b>POD</b>	PML oncogenic domains
<b>Rb</b>	Retinoblastom
<b>RBE</b>	Rep binding element
<b>RFC</b>	replication factor C
<b>RING</b>	really interesting new gene
<b>RNF4</b>	RING finger protein 4
<b>RPA</b>	replication protein A
<b>SCLC</b>	small cell lung cancer
<b>SIM</b>	SUMO interaction motif
<b>ssDBD</b>	single-stranded DNA binding domain
<b>STUbL</b>	SUMO-targeted Ubiquitin Ligase
<b>SUMO</b>	small ubiquitin like modifier
<b>SV40</b>	simian virus 40
<b>TBP</b>	TATA box binding protein
<b>TCR</b>	transcription coupled DNA repair
<b>TFIIIC</b>	Genereller RNA Polymerase III Transkriptionsfaktor IIIC
<b>TK</b>	Thymin Kinase
<b>TNNT1</b>	troponin T1 gene
<b>TRPS</b>	Trichorhinophalangeale Syndrome
<b>TRPS1</b>	durch das TRPS1 Gen kodierter Transkriptionsfaktor
<b>TRS</b>	terminal resolution site
<b>UBC9</b>	ubiquitin conjugating enzyme 9
<b>URR</b>	upstream regulatory region
<b>VA-RNA</b>	virus-associated RNA
<b>YY1</b>	Yin Yang 1 Transkriptionsfaktor

## 5 Literatur

1. Adamson, A. L., and S. Kenney. 2001. Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol* 75:2388-99.
2. Alsner, J., J. Q. Svejstrup, E. Kjeldsen, B. S. Sorensen, and O. Westergaard. 1992. Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J Biol Chem* 267:12408-11.
3. Antoni, B. A., A. B. Rabson, I. L. Miller, J. P. Trempe, N. Chejanovsky, and B. J. Carter. 1991. Adeno-associated virus Rep protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in human cells. *J Virol* 65:396-404.
4. Atchison, R. W., B. C. Casto, and W. Hammon. 1965. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149:754-756.
5. Banerjee, S., B. R. Kumar, and T. K. Kundu. 2004. General transcriptional coactivator PC4 activates p53 function. *Mol Cell Biol* 24:2052-62.
6. Bantel-Schaal, U. 1990. Adeno-associated parvoviruses inhibit growth of cells derived from malignant human tumors. *Int J Cancer* 45:190-4.
7. Bantel-Schaal, U. 1995. Growth properties of a human melanoma cell line are altered by adeno-associated parvovirus type 2. *Int J Cancer* 60:269-74.
8. Bantel-Schaal, U., and M. Stohr. 1992. Influence of adeno-associated virus on adherence and growth properties of normal cells. *J Virol* 66:773-9.
9. Bantel-Schaal, U., and H. zur Hausen. 1988. Adeno-associated viruses inhibit SV40 DNA amplification and replication of herpes simplex virus in SV40-transformed hamster cells. *Virology* 164:64-74.
10. Bantel-Schaal, U., and H. zur Hausen. 1984. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 134:52-63.
11. Batchu, R. B., and P. L. Hermonat. 1995. Dissociation of conventional DNA binding and endonuclease activities by an adeno-associated virus Rep78 mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 210:717-25.
12. Batchu, R. B., and P. L. Hermonat. 1995. The trans-inhibitory Rep78 protein of adeno-associated virus binds to TAR region DNA of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *FEBS Lett* 367:267-71.
13. Batchu, R. B., R. M. Kotin, and P. L. Hermonat. 1994. The regulatory rep protein of adeno-associated virus binds to sequences within the c-H-ras promoter. *Cancer Lett* 86:23-31.
14. Batchu, R. B., M. A. Shamma, J. Y. Wang, and N. C. Munshi. 1999. Interaction of adeno-associated virus Rep78 with p53: implications in growth inhibition. *Cancer Res* 59:3592-5.

15. Bayer, P., A. Arndt, S. Metzger, R. Mahajan, F. Melchior, R. Jaenicke, and J. Becker. 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280:275-86.
16. Beaton, A., P. Palumbo, and K. I. Berns. 1989. Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J Virol* 63:4450-4.
17. Becerra, S. P., F. Koczot, P. Fabisch, and J. A. Rose. 1988. Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript. *J Virol* 62:2745-54.
18. Bernier-Villamor, V., D. A. Sampson, M. J. Matunis, and C. D. Lima. 2002. Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108:345-56.
19. Bharti, A. K., M. O. Olson, D. W. Kufe, and E. H. Rubin. 1996. Identification of a nucleolin binding site in human topoisomerase I. *J Biol Chem* 271:1993-7.
20. Bischof, O., K. Schwamborn, N. Martin, A. Werner, C. Sustmann, R. Grosschedl, and A. Dejean. 2006. The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis. *Mol Cell* 22:783-94.
21. Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, M. S. Sereno, C. D. Brandt, H. W. Kim, R. H. Parrott, and R. M. Chanock. 1971. A seroepidemiologic study of adenovirus-associated virus infection in infants and children. *Am J Epidemiol* 94:359-66.
22. Boisvert, F. M., M. J. Hendzel, and D. P. Bazett-Jones. 2000. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol* 148:283-92.
23. Boisvert, F. M., M. J. Kruhlak, A. K. Box, M. J. Hendzel, and D. P. Bazett-Jones. 2001. The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* 152:1099-106.
24. Brandsen, J., S. Werten, P. C. van der Vliet, M. Meisterernst, J. Kroon, and P. Gros. 1997. C-terminal domain of transcription cofactor PC4 reveals dimeric ssDNA binding site. *Nat Struct Biol* 4:900-3.
25. Brister, J. R., and N. Muzyczka. 2000. Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol* 74:7762-71.
26. Brister, J. R., and N. Muzyczka. 1999. Rep-mediated nicking of the adeno-associated virus origin requires two biochemical activities, DNA helicase activity and transesterification. *J Virol* 73:9325-36.
27. Buller, R. M., J. E. Janik, E. D. Sebring, and J. A. Rose. 1981. Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40:241-7.
28. Calvo, O., and J. L. Manley. 2001. Evolutionarily conserved interaction between CstF-64 and PC4 links transcription, polyadenylation, and termination. *Mol Cell* 7:1013-23.

29. Carter, B. J., B. A. Antoni, and D. F. Klessig. 1992. Adenovirus containing a deletion of the early region 2A gene allows growth of adeno-associated virus with decreased efficiency. *Virology* 191:473-6.
30. Carter, B. J., C. A. Laughlin, L. M. de la Maza, and M. Myers. 1979. Adeno-associated virus autointerference. *Virology* 92:449-62.
31. Carter, S., O. Bischof, A. Dejean, and K. H. Vousden. 2007. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* 9:428-35.
32. Cassell, G. D., and M. D. Weitzman. 2004. Characterization of a nuclear localization signal in the C-terminus of the adeno-associated virus Rep68/78 proteins. *Virology* 327:206-14.
33. Casto, B. C., J. A. Armstrong, R. W. Atchison, and W. M. Hammon. 1967. Studies on the relationship between adeno-associated virus type 1 (AAV-1) and adenoviruses. II. Inhibition of adenovirus plaques by AAV; its nature and specificity. *Virology* 33:452-8.
34. Cathomen, T., D. Collete, and M. D. Weitzman. 2000. A chimeric protein containing the N terminus of the adeno-associated virus Rep protein recognizes its target site in an in vivo assay. *J Virol* 74:2372-82.
35. Chadeuf, G., D. Favre, J. Tessier, N. Provost, P. Nony, J. Kleinschmidt, P. Moullier, and A. Salvetti. 2000. Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome [In Process Citation]. *J Gene Med* 2:260-8.
36. Chakrabarti, S. R., R. Sood, S. Nandi, and G. Nucifora. 2000. Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13281-5.
37. Champoux, J. J. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70:369-413.
38. Chang, L. S., and T. Shenk. 1990. The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. *J Virol* 64:2103-9.
39. Chang, L. S., Y. Shi, and T. Shenk. 1989. Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. *J Virol* 63:3479-88.
40. Chejanovsky, N., and B. J. Carter. 1989. Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication. *Virology* 173:120-8.
41. Chejanovsky, N., and B. J. Carter. 1990. Mutation of a consensus purine nucleotide binding site in the adeno-associated virus rep gene generates a dominant negative phenotype for DNA replication. *J Virol* 64:1764-70.
42. Chen, A. Y., and L. F. Liu. 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:191-218.

43. Chen, C. L., R. L. Jensen, B. C. Schnepf, M. J. Connell, R. Shell, T. J. Sferra, J. S. Bartlett, K. R. Clark, and P. R. Johnson. 2005. Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children. *J Virol* 79:14781-92.
44. Cheung, A. K., M. D. Hoggan, W. W. Hauswirth, and K. I. Berns. 1980. Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J Virol* 33:739-48.
45. Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields. 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9578-82.
46. Chiorini, J. A., S. M. Wiener, R. A. Owens, S. R. Kyostio, R. M. Kotin, and B. Safer. 1994. Sequence requirements for stable binding and function of Rep68 on the adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeats. *J Virol* 68:7448-57.
47. Chiorini, J. A., L. Yang, B. Safer, and R. M. Kotin. 1995. Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *J Virol* 69:7334-8.
48. Chiorini, J. A., B. Zimmermann, L. Yang, R. H. Smith, A. Ahearn, F. Herberg, and R. M. Kotin. 1998. Inhibition of PrKX, a novel protein kinase, and the cyclic AMP-dependent protein kinase PKA by the regulatory proteins of adeno-associated virus type 2. *Mol Cell Biol* 18:5921-9.
49. Christensen, M. O., H. U. Barthelmes, S. Feineis, B. R. Knudsen, A. H. Andersen, F. Boege, and C. Mielke. 2002. Changes in mobility account for camptothecin-induced subnuclear relocation of topoisomerase I. *J Biol Chem* 277:15661-5.
50. Christensen, M. O., R. M. Krokowski, H. U. Barthelmes, R. Hock, F. Boege, and C. Mielke. 2004. Distinct effects of topoisomerase I and RNA polymerase I inhibitors suggest a dual mechanism of nucleolar/nucleoplasmic partitioning of topoisomerase I. *J Biol Chem* 279:21873-82.
51. Chu, D., N. Kakazu, M. J. Gorrin-Rivas, H. P. Lu, M. Kawata, T. Abe, K. Ueda, and Y. Adachi. 2001. Cloning and characterization of LUN, a novel ring finger protein that is highly expressed in lung and specifically binds to a palindromic sequence. *J Biol Chem* 276:14004-13.
52. Collaco, R., K. M. Prasad, and J. P. Trempe. 1997. Phosphorylation of the adeno-associated virus replication proteins. *Virology* 232:332-6.
53. Costello, E., P. Saudan, E. Winocour, L. Pizer, and P. Beard. 1997. High mobility group chromosomal protein 1 binds to the adeno-associated virus replication protein (Rep) and promotes Rep-mediated site-specific cleavage of DNA, ATPase activity and transcriptional repression. *Embo J* 16:5943-54.
54. Cukor, G., N. R. Blacklow, S. Kibrick, and I. C. Swan. 1975. Effect of adeno-associated virus on cancer expression by herpesvirus-transformed hamster cells. *J Natl Cancer Inst* 55:957-9.

55. D'Orazi, G., B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. Saito, M. Gostissa, S. Coen, A. Marchetti, G. Del Sal, G. Piaggio, M. Fanciulli, E. Appella, and S. Soddu. 2002. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4:11-9.
56. Davis, M. D., R. S. Wonderling, S. L. Walker, and R. A. Owens. 1999. Analysis of the effects of charge cluster mutations in adeno-associated virus Rep68 protein in vitro. *J Virol* 73:2084-93.
57. Davis, M. D., J. Wu, and R. A. Owens. 2000. Mutational analysis of adeno-associated virus type 2 Rep68 protein endonuclease activity on partially single-stranded substrates. *J Virol* 74:2936-42.
58. de la Maza, L. M., and B. J. Carter. 1981. Inhibition of adenovirus oncogenicity in hamsters by adeno-associated virus DNA. *J Natl Cancer Inst* 67:1323-6.
59. Dellaire, G., and D. P. Bazett-Jones. 2004. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26:963-77.
60. Desai, S. D., T. K. Li, A. Rodriguez-Bauman, E. H. Rubin, and L. F. Liu. 2001. Ubiquitin/26S proteasome-mediated degradation of topoisomerase I as a resistance mechanism to camptothecin in tumor cells. *Cancer Res* 61:5926-32.
61. Desai, S. D., H. Zhang, A. Rodriguez-Bauman, J. M. Yang, X. Wu, M. K. Gounder, E. H. Rubin, and L. F. Liu. 2003. Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Mol Cell Biol* 23:2341-50.
62. Desdouets, C., G. Matesic, C. A. Molina, N. S. Foulkes, P. Sassone-Corsi, C. Brechet, and J. Sobczak-Thepot. 1995. Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol* 15:3301-9.
63. Desterro, J. M., M. S. Rodriguez, and R. T. Hay. 1998. SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2:233-9.
64. Di Pasquale, G., and S. N. Stacey. 1998. Adeno-associated virus Rep78 protein interacts with protein kinase A and its homolog PRKX and inhibits CREB-dependent transcriptional activation. *J Virol* 72:7916-25.
65. Doucas, V., A. M. Ishov, A. Romo, H. Juguilon, M. D. Weitzman, R. M. Evans, and G. G. Maul. 1996. Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev* 10:196-207.
66. Dubielzig, R., J. A. King, S. Weger, A. Kern, and J. A. Kleinschmidt. 1999. Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes. *J Virol* 73:8989-98.
67. Duprez, E., A. J. Saurin, J. M. Desterro, V. Lallemand-Breitenbach, K. Howe, M. N. Boddy, E. Solomon, H. de The, R. T. Hay, and P. S. Freemont. 1999. SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112:381-93.

68. Dutheil, N., F. Shi, T. Dupressoir, and R. M. Linden. 2000. Adeno-associated virus site-specifically integrates into a muscle-specific DNA region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4862-6.
69. Everett, R. D., P. Lomonte, T. Sternsdorf, R. van Driel, and A. Orr. 1999. Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* 112:4581-8.
70. Ferrari, F. K., T. Samulski, T. Shenk, and R. J. Samulski. 1996. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70:3227-34.
71. Fields, S., and R. Sternglanz. 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10:286-92.
72. Fisher, K. J., G. P. Gao, M. D. Weitzman, R. DeMatteo, J. F. Burda, and J. M. Wilson. 1996. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* 70:520-32.
73. Flavell, S. W., C. W. Cowan, T. K. Kim, P. L. Greer, Y. Lin, S. Paradis, E. C. Griffith, L. S. Hu, C. Chen, and M. E. Greenberg. 2006. Activity-dependent regulation of MEF2 transcription factors suppresses excitatory synapse number. *Science* 311:1008-12.
74. Fogal, V., M. Gostissa, P. Sandy, P. Zacchi, T. Sternsdorf, K. Jensen, P. P. Pandolfi, H. Will, C. Schneider, and G. Del Sal. 2000. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *Embo J* 19:6185-95.
75. Friedman-Einat, M., Z. Grossman, F. Mileguir, Z. Smetana, M. Ashkenazi, G. Barkai, N. Varsano, E. Glick, and E. Mendelson. 1997. Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. *J Clin Microbiol* 35:71-8.
76. Fu, X. D. 1995. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *Rna* 1:663-80.
77. Gao, G. P., M. R. Alvira, L. Wang, R. Calcedo, J. Johnston, and J. M. Wilson. 2002. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11854-9.
78. Gavin, D. K., S. M. Young, Jr., W. Xiao, B. Temple, C. R. Abernathy, D. J. Pereira, N. Muzyczka, and R. J. Samulski. 1999. Charge-to-alanine mutagenesis of the adeno-associated virus type 2 Rep78/68 proteins yields temperature-sensitive and magnesium-dependent variants [published erratum appears in *J Virol* 2000 Jan;74(1):591]. *J Virol* 73:9433-45.
79. Ge, H., and R. G. Roeder. 1994. Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes. *Cell* 78:513-23.
80. Ge, H., Y. Zhao, B. T. Chait, and R. G. Roeder. 1994. Phosphorylation negatively regulates the function of coactivator PC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12691-5.



81. Georg-Fries, B., S. Biederlack, J. Wolf, and H. zur Hausen. 1984. Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus. *Virology* 134:64-71.
82. Gocke, C. B., H. Yu, and J. Kang. 2005. Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J Biol Chem* 280:5004-12.
83. Gostissa, M., A. Hengstermann, V. Fogal, P. Sandy, S. E. Schwarz, M. Scheffner, and G. Del Sal. 1999. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18:6462-71.
84. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.
85. Gregoire, S., A. M. Tremblay, L. Xiao, Q. Yang, K. Ma, J. Nie, Z. Mao, Z. Wu, V. Giguere, and X. J. Yang. 2006. Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *J Biol Chem* 281:4423-33.
86. Grossman, Z., E. Mendelson, F. Brok-Simoni, F. Mileguir, Y. Leitner, G. Rechavi, and B. Ramot. 1992. Detection of adeno-associated virus type 2 in human peripheral blood cells. *J Gen Virol* 73:961-6.
87. Haluska, P., Jr., A. Saleem, Z. Rasheed, F. Ahmed, E. W. Su, L. F. Liu, and E. H. Rubin. 1999. Interaction between human topoisomerase I and a novel RING finger/arginine-serine protein. *Nucleic Acids Res* 27:2538-44.
88. Han, S. I., M. A. Kawano, K. Ishizu, H. Watanabe, M. Hasegawa, S. N. Kanesashi, Y. S. Kim, A. Nakanishi, K. Kataoka, and H. Handa. 2004. Rep68 protein of adeno-associated virus type 2 interacts with 14-3-3 proteins depending on phosphorylation at serine 535. *Virology* 320:144-55.
89. Hannan, K. M., R. D. Hannan, and L. I. Rothblum. 1998. Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci* 3:d376-98.
90. Hauswirth, W. W., and K. I. Berns. 1977. Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication. *Virology* 78:488-99.
91. Hay, R. T. 2005. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18:1-12.
92. Hecker, C. M., M. Rabiller, K. Haglund, P. Bayer, and I. Dikic. 2006. Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281:16117-27.
93. Heilbronn, R., A. Burkle, S. Stephan, and H. zur Hausen. 1990. The adeno-associated virus rep gene suppresses herpes simplex virus-induced DNA amplification. *J Virol* 64:3012-8.
94. Heilbronn, R., M. Engstler, S. Weger, A. Krahn, C. Schetter, and M. Boshart. 2003. ssDNA-dependent colocalization of adeno-associated virus Rep and herpes simplex virus ICP8 in nuclear replication domains. *Nucleic Acids Res* 31:6206-13.
95. Heilbronn, R., J. R. Schlehofer, and H. zur Hausen. 1984. Selective killing of carcinogen-treated SV40-transformed Chinese hamster cells by a defective parvovirus. *Virology* 136:439-41.

96. Hermanns, J., A. Schulze, P. Jansen-Db1urr, J. A. Kleinschmidt, R. Schmidt, and H. zur Hausen. 1997. Infection of primary cells by adeno-associated virus type 2 results in a modulation of cell cycle-regulating proteins. *J Virol* 71:6020-7.
97. Hermonat, P. L. 1994. Adeno-associated virus inhibits human papillomavirus type 16: a viral interaction implicated in cervical cancer. *Cancer Res* 54:2278-81.
98. Hermonat, P. L. 1989. The adeno-associated virus Rep78 gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus. *Virology* 172:253-61.
99. Hermonat, P. L. 1994. Down-regulation of the human c-fos and c-myc proto-oncogene promoters by adeno-associated virus Rep78. *Cancer Lett* 81:129-36.
100. Hermonat, P. L. 1992. Inhibition of bovine papillomavirus plasmid DNA replication by adeno-associated virus. *Virology* 189:329-33.
101. Hermonat, P. L. 1991. Inhibition of H-ras expression by the adeno-associated virus Rep78 transformation suppressor gene product. *Cancer Res* 51:3373-7.
102. Hermonat, P. L., M. A. Labow, R. Wright, K. I. Berns, and N. Muzyczka. 1984. Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J Virol* 51:329-39.
103. Hermonat, P. L., A. D. Santin, and R. B. Batchu. 1996. The adeno-associated virus Rep78 major regulatory/transformation suppressor protein binds cellular Sp1 in vitro and evidence of a biological effect. *Cancer Res* 56:5299-304.
104. Hermonat, P. L., A. D. Santin, R. B. Batchu, and D. Zhan. 1998. The adeno-associated virus Rep78 major regulatory protein binds the cellular TATA-binding protein in vitro and in vivo. *Virology* 245:120-7.
105. Hertzberg, R. P., R. W. Busby, M. J. Caranfa, K. G. Holden, R. K. Johnson, S. M. Hecht, and W. D. Kingsbury. 1990. Irreversible trapping of the DNA-topoisomerase I covalent complex. Affinity labeling of the camptothecin binding site. *J Biol Chem* 265:19287-95.
106. Hertzberg, R. P., M. J. Caranfa, and S. M. Hecht. 1989. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry* 28:4629-38.
107. Hickman, A. B., D. R. Ronning, R. M. Kotin, and F. Dyda. 2002. Structural unity among viral origin binding proteins: crystal structure of the nuclease domain of adeno-associated virus Rep. *Mol Cell* 10:327-37.
108. Hietakangas, V., J. K. Ahlskog, A. M. Jakobsson, M. Hellesuo, N. M. Sahlberg, C. I. Holmberg, A. Mikhailov, J. J. Palvimo, L. Pirkkala, and L. Sistonen. 2003. Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 23:2953-68.
109. Hietakangas, V., J. Anckar, H. A. Blomster, M. Fujimoto, J. J. Palvimo, A. Nakai, and L. Sistonen. 2006. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:45-50.

110. Hilgarth, R. S., Y. Hong, O. K. Park-Sarge, and K. D. Sarge. 2003. Insights into the regulation of heat shock transcription factor 1 SUMO-1 modification. *Biochem Biophys Res Commun* 303:196-200.
111. Hochstrasser, M. 2001. SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107:5-8.
112. Hoege, C., B. Pfander, G. L. Moldovan, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419:135-41.
113. Hoeijmakers, J. H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-74.
114. Hofmann, T. G., A. Moller, H. Sirma, H. Zentgraf, Y. Taya, W. Droge, H. Will, and M. L. Schmitz. 2002. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* 4:1-10.
115. Hoppe, T. 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 30:183-7.
116. Horie, K., A. Tomida, Y. Sugimoto, T. Yasugi, H. Yoshikawa, Y. Taketani, and T. Tsuruo. 2002. SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation induced by camptothecin. *Oncogene* 21:7913-22.
117. Hsiang, Y. H., R. Hertzberg, S. Hecht, and L. F. Liu. 1985. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260:14873-8.
118. Hsiang, Y. H., and L. F. Liu. 1988. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 48:1722-6.
119. Ilyina, T. V., and E. V. Koonin. 1992. Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaebacteria. *Nucleic Acids Res* 20:3279-85.
120. Im, D. S., and N. Muzyczka. 1990. The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell* 61:447-57.
121. Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, D. Negorev, O. V. Vladimirova, N. Neff, T. Kamitani, E. T. Yeh, J. F. Strauss, and G. G. Maul. 1999. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147:221-34.
122. Janik, J. E., M. M. Huston, K. Cho, and J. A. Rose. 1989. Efficient synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both adenovirus DNA binding protein and VA I RNA. *Virology* 168:320-9.
123. Jay, F. T., C. A. Laughlin, and B. J. Carter. 1981. Eukaryotic translational control: adeno-associated virus protein synthesis is affected by a mutation in the adenovirus DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:2927-31.

124. Jing, X. J., V. Kalman-Maltese, X. Cao, Q. Yang, and J. P. Trempe. 2001. Inhibition of adenovirus cytotoxicity, replication, and E2a gene expression by adeno-associated virus. *Virology* 291:140-51.
125. Johnson, E. S. 2004. Protein modification by sumo. *Annu Rev Biochem* 73:355-82.
126. Johnson, E. S., and G. Blobel. 1997. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 272:26799-802.
127. Johnson, E. S., I. Schwienhorst, R. J. Dohmen, and G. Blobel. 1997. The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J* 16:5509-19.
128. Kagey, M. H., T. A. Melhuish, and D. Wotton. 2003. The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113:127-37.
129. Kahyo, T., T. Nishida, and H. Yasuda. 2001. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8:713-8.
130. Kaiser, F. J. 2003. Identifizierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors TRPS1. Doktorarbeit. Universität Duisburg-Essen, Essen.
131. Kaiser, F. J., H. J. Ludecke, and S. Weger. 2007. SUMOylation modulates transcriptional repression by TRPS1. *Biol Chem* 388:381-90.
132. Kaludov, N., K. E. Brown, R. W. Walters, J. Zabner, and J. A. Chiorini. 2001. Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* 75:6884-93.
133. Kamitani, T., K. Kito, H. P. Nguyen, H. Wada, T. Fukuda-Kamitani, and E. T. Yeh. 1998. Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273:26675-82.
134. Kamitani, T., H. P. Nguyen, K. Kito, T. Fukuda-Kamitani, and E. T. Yeh. 1998. Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273:3117-20.
135. Kang, J., C. B. Gocke, and H. Yu. 2006. Phosphorylation-facilitated sumoylation of MEF2C negatively regulates its transcriptional activity. *BMC Biochem* 7:5.
136. Kannan, P., and M. A. Tainsky. 1999. Coactivator PC4 mediates AP-2 transcriptional activity and suppresses ras-induced transformation dependent on AP-2 transcriptional interference. *Mol Cell Biol* 19:899-908.
137. Khleif, S. N., T. Myers, B. J. Carter, and J. P. Trempe. 1991. Inhibition of cellular transformation by the adeno-associated virus rep gene. *Virology* 181:738-41.
138. Kim, S. K., J. Y. Ro, B. L. Kemp, J. S. Lee, T. J. Kwon, K. M. Fong, Y. Sekido, J. D. Minna, W. K. Hong, and L. Mao. 1997. Identification of three distinct tumor suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Cancer Res* 57:400-3.

139. Kim, Y. H., C. Y. Choi, and Y. Kim. 1999. Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12350-5.
140. King, J. A., R. Dubielzig, D. Grimm, and J. A. Kleinschmidt. 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *Embo J* 20:3282-91.
141. Kirschstein, R. L., K. O. Smith, and E. A. Peters. 1968. Inhibition of adenovirus 12 oncogenicity by adeno-associated virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 128:670-3.
142. Kishore, A. H., K. Batta, C. Das, S. Agarwal, and T. K. Kundu. 2007. p53 regulates its own activator - transcriptional coactivator PC4: A new p53 responsive gene. *Biochem J*.
143. Klein-Bauernschmitt, P., H. zur Hausen, and J. R. Schlehofer. 1992. Induction of differentiation-associated changes in established human cells by infection with adeno-associated virus type 2. *J Virol* 66:4191-200.
144. Kleinschmidt, J. A., M. Mohler, F. W. Weindler, and R. Heilbronn. 1995. Sequence elements of the adeno-associated virus rep gene required for suppression of herpes-simplex-virus-induced DNA amplification. *Virology* 206:254-62.
145. Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, and S. Jentsch. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96:635-44.
146. Kotin, R. M., and K. I. Berns. 1989. Organization of adeno-associated virus DNA in latently infected Detroit 6 cells. *Virology* 170:460-7.
147. Kotin, R. M., R. M. Linden, and K. I. Berns. 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* 11:5071-8.
148. Kotin, R. M., J. C. Menninger, D. C. Ward, and K. I. Berns. 1991. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 10:831-4.
149. Kotin, R. M., M. Siniscalco, R. J. Samulski, X. D. Zhu, L. Hunter, C. A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi, and K. I. Berns. 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2211-5.
150. Kretzschmar, M., K. Kaiser, F. Lottspeich, and M. Meisterernst. 1994. A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators. *Cell* 78:525-34.
151. Kube, D. M., S. Ponnazhagan, and A. Srivastava. 1997. Encapsidation of adeno-associated virus type 2 Rep proteins in wild-type and recombinant progeny virions: Rep-mediated growth inhibition of primary human cells. *J Virol* 71:7361-71.
152. Kurki, S., L. Latonen, and M. Laiho. 2003. Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. *J Cell Sci* 116:3917-25.

153. Kwek, S. S., J. Derry, A. L. Tyner, Z. Shen, and A. V. Gudkov. 2001. Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1. *Oncogene* 20:2587-99.
154. Kyostio, S. R., R. A. Owens, M. D. Weitzman, B. A. Antoni, N. Chejanovsky, and B. J. Carter. 1994. Analysis of adeno-associated virus (AAV) wild-type and mutant Rep proteins for their abilities to negatively regulate AAV p5 and p19 mRNA levels. *J Virol* 68:2947-57.
155. Kyostio, S. R., R. S. Wonderling, and R. A. Owens. 1995. Negative regulation of the adeno-associated virus (AAV) P5 promoter involves both the P5 rep binding site and the consensus ATP-binding motif of the AAV Rep68 protein. *J Virol* 69:6787-96.
156. Labourier, E., F. Rossi, I. E. Gallouzi, E. Allemand, G. Divita, and J. Tazi. 1998. Interaction between the N-terminal domain of human DNA topoisomerase I and the arginine-serine domain of its substrate determines phosphorylation of SF2/ASF splicing factor. *Nucleic Acids Res* 26:2955-62.
157. Labow, M. A., L. H. Graf, Jr., and K. I. Berns. 1987. Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol Cell Biol* 7:1320-5.
158. Labow, M. A., P. L. Hermonat, and K. I. Berns. 1986. Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome. *J Virol* 60:251-8.
159. Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honore, A. Doubeikovsky, E. Duprez, P. P. Pandolfi, E. Puvion, P. Freemont, and H. de The. 2001. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193:1361-71.
160. Laughlin, C. A., C. B. Cardellichio, and H. C. Coon. 1986. Latent infection of KB cells with adeno-associated virus type 2. *J Virol* 60:515-24.
161. Laughlin, C. A., N. Jones, and B. J. Carter. 1982. Effect of deletions in adenovirus early region 1 genes upon replication of adeno-associated virus. *J Virol* 41:868-76.
162. Laughlin, C. A., M. W. Myers, D. L. Risin, and B. J. Carter. 1979. Defective-interfering particles of the human parvovirus adeno-associated virus. *Virology* 94:162-74.
163. Laughlin, C. A., H. Westphal, and B. J. Carter. 1979. Spliced adenovirus-associated virus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5567-71.
164. Leppard, J. B., and J. J. Champoux. 2005. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma* 114:75-85.
165. Li, M., C. L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, and W. Gu. 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302:1972-5.
166. Li, T. K., and L. F. Liu. 2001. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:53-77.

167. Lin, L., T. Ozaki, Y. Takada, H. Kageyama, Y. Nakamura, A. Hata, J. H. Zhang, W. F. Simonds, A. Nakagawara, and H. Koseki. 2005. topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a coactivator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* 24:3385-96.
168. Liu, F., and M. R. Green. 1994. Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature* 368:520-5.
169. Liu, L. F. 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 58:351-75.
170. Lochrie, M. A., G. P. Tatsuno, A. E. Arbetman, K. Jones, C. Pater, P. H. Smith, J. W. McDonnell, S. Z. Zhou, S. Kachi, M. Kachi, P. A. Campochiaro, G. F. Pierce, and P. Colosi. 2006. Adeno-associated virus (AAV) capsid genes isolated from rat and mouse liver genomic DNA define two new AAV species distantly related to AAV-5. *Virology* 353:68-82.
171. Lorick, K. L., J. P. Jensen, S. Fang, A. M. Ong, S. Hatakeyama, and A. M. Weissman. 1999. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11364-9.
172. Lusby, E., R. Bohenzky, and K. I. Berns. 1981. Inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA: independence of the orientation at either end of the genome. *J Virol* 37:1083-6.
173. Lusby, E., K. H. Fife, and K. I. Berns. 1980. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* 34:402-9.
174. Lusby, E. W., and K. I. Berns. 1982. Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome. *J Virol* 41:518-26.
175. Mah, C., K. Qing, B. Khuntirat, S. Ponnazhagan, X. S. Wang, D. M. Kube, M. C. Yoder, and A. Srivastava. 1998. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression. *J Virol* 72:9835-43.
176. Mao, Y., M. Sun, S. D. Desai, and L. F. Liu. 2000. SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4046-51.
177. Marcus, C. J., C. A. Laughlin, and B. J. Carter. 1981. Adeno-associated virus RNA transcription in vivo. *Eur J Biochem* 121:147-54.
178. Mayor, H. D., S. Drake, J. Stahmann, and D. M. Mumford. 1976. Antibodies to adeno-associated satellite virus and herpes simplex in sera from cancer patients and normal adults. *Am J Obstet Gynecol* 126:100-4.
179. Mayor, H. D., G. S. Houlditch, and D. M. Mumford. 1973. Influence of adeno-associated satellite virus on adenovirus-induced tumours in hamsters. *Nat New Biol* 241:44-6.

180. McCarty, D. M., M. Christensen, and N. Muzyczka. 1991. Sequences required for coordinate induction of adeno-associated virus p19 and p40 promoters by Rep protein. *J Virol* 65:2936-45.
181. McCarty, D. M., T. H. Ni, and N. Muzyczka. 1992. Analysis of mutations in adeno-associated virus Rep protein in vivo and in vitro. *J Virol* 66:4050-7.
182. McCarty, D. M., D. J. Pereira, I. Zolotukhin, X. Zhou, J. H. Ryan, and N. Muzyczka. 1994. Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J Virol* 68:4988-97.
183. McCarty, D. M., J. H. Ryan, S. Zolotukhin, X. Zhou, and N. Muzyczka. 1994. Interaction of the adeno-associated virus Rep protein with a sequence within the A palindrome of the viral terminal repeat. *J Virol* 68:4998-5006.
184. McLaughlin, S. K., P. Collis, P. L. Hermonat, and N. Muzyczka. 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62:1963-73.
185. McPherson, R. A., L. J. Rosenthal, and J. A. Rose. 1985. Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* 147:217-22.
186. Melchior, F. 2000. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:591-626.
187. Melchior, F., M. Schergaut, and A. Pichler. 2003. SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* 28:612-8.
188. Mendelson, E., J. P. Trempe, and B. J. Carter. 1986. Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *J Virol* 60:823-32.
189. Michael, D., and M. Oren. 2003. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 13:49-58.
190. Mishra, L., and J. A. Rose. 1990. Adeno-associated virus DNA replication is induced by genes that are essential for HSV-1 DNA synthesis. *Virology* 179:632-9.
191. Miyauchi, Y., S. Yogosawa, R. Honda, T. Nishida, and H. Yasuda. 2002. Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem* 277:50131-6.
192. Mo, Y. Y., C. Wang, and W. T. Beck. 2000. A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 275:41107-13.
193. Mo, Y. Y., Y. Yu, Z. Shen, and W. T. Beck. 2002. Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem* 277:2958-64.
194. Montminy, M. 1997. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66:807-22.
195. Mouw, M. B., and D. J. Pintel. 2000. Adeno-associated virus RNAs appear in a temporal order and their splicing is stimulated during coinfection with adenovirus [In Process Citation]. *J Virol* 74:9878-88.



196. Muller, M. T., W. P. Pfund, V. B. Mehta, and D. K. Trask. 1985. Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *Embo J* 4:1237-43.
197. Muller, S., M. Berger, F. Lehembre, J. S. Seeler, Y. Haupt, and A. Dejean. 2000. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275:13321-9.
198. Muralidhar, S., S. P. Becerra, and J. A. Rose. 1994. Site-directed mutagenesis of adeno-associated virus type 2 structural protein initiation codons: effects on regulation of synthesis and biological activity. *J Virol* 68:170-6.
199. Muramatsu, S., A. Handa, S. Kajigaya, and K. E. Brown. 1998. Transcription-positive cofactor 4 enhances rescue of adeno-associated virus genome from an infectious clone. *J Gen Virol* 79:2157-61.
200. Musatov, S. A., T. A. Scully, L. Dudus, and K. J. Fisher. 2000. Induction of circular episomes during rescue and replication of adeno-associated virus in experimental models of virus latency [In Process Citation]. *Virology* 275:411-32.
201. Muzyczka, N. 1992. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158:97-129.
202. Muzyczka, N., and K. I. Berns. 2001. Parvoviridae: The Viruses and Their Replication, p. 2327-59, *Fields Virology*, Fourth Edition, 2001.
203. Myers, M. W., and B. J. Carter. 1980. Assembly of adeno-associated virus. *Virology* 102:71-82.
204. Myers, M. W., C. A. Laughlin, F. T. Jay, and B. J. Carter. 1980. Adenovirus helper function for growth of adeno-associated virus: effect of temperature-sensitive mutations in adenovirus early gene region 2. *J Virol* 35:65-75.
205. Nacerddine, K., F. Lehembre, M. Bhaumik, J. Artus, M. Cohen-Tannoudji, C. Babinet, P. P. Pandolfi, and A. Dejean. 2005. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9:769-79.
206. Narasimhan, D., R. Collaco, V. Kalman-Maltese, and J. P. Trempe. 2002. Hyperphosphorylation of the adeno-associated virus Rep78 protein inhibits terminal repeat binding and helicase activity. *Biochim Biophys Acta* 1576:298-305.
207. Negorev, D., and G. G. Maul. 2001. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20:7234-42.
208. Nelson, V., G. E. Davis, and S. A. Maxwell. 2001. A putative protein inhibitor of activated STAT (PIASy) interacts with p53 and inhibits p53-mediated transactivation but not apoptosis. *Apoptosis* 6:221-34.
209. Ni, T. H., W. F. McDonald, I. Zolotukhin, T. Melendy, S. Waga, B. Stillman, and N. Muzyczka. 1998. Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J Virol* 72:2777-87.

210. Nitiss, J. L., and J. C. Wang. 1996. Mechanisms of cell killing by drugs that trap covalent complexes between DNA topoisomerases and DNA. *Mol Pharmacol* 50:1095-102.
211. Nony, P., J. Tessier, G. Chadeuf, P. Ward, A. Giraud, M. Dugast, R. M. Linden, P. Moullier, and A. Salvetti. 2001. Novel cis-acting replication element in the adeno-associated virus type 2 genome is involved in amplification of integrated rep-cap sequences. *J Virol* 75:9991-4.
212. Oelze, I., K. Rittner, and G. Sczakiel. 1994. Adeno-associated virus type 2 rep gene-mediated inhibition of basal gene expression of human immunodeficiency virus type 1 involves its negative regulatory functions. *J Virol* 68:1229-33.
213. Ogston, P., K. Raj, and P. Beard. 2000. Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *J Virol* 74:3494-504.
214. Ostrove, J. M., D. H. Duckworth, and K. I. Berns. 1981. Inhibition of adenovirus-transformed cell oncogenicity by adeno-associated virus. *Virology* 113:521-33.
215. Owens, R. A., and B. J. Carter. 1992. In vitro resolution of adeno-associated virus DNA hairpin termini by wild-type Rep protein is inhibited by a dominant-negative mutant of rep. *J Virol* 66:1236-40.
216. Owens, R. A., J. P. Trempe, N. Chejanovsky, and B. J. Carter. 1991. Adeno-associated virus rep proteins produced in insect and mammalian expression systems: wild-type and dominant-negative mutant proteins bind to the viral replication origin. *Virology* 184:14-22.
217. Owens, R. A., M. D. Weitzman, S. R. Kyostio, and B. J. Carter. 1993. Identification of a DNA-binding domain in the amino terminus of adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol* 67:997-1005.
218. Oyanagi, H., K. Takenaka, S. Ishikawa, Y. Kawano, Y. Adachi, K. Ueda, H. Wada, and F. Tanaka. 2004. Expression of LUN gene that encodes a novel RING finger protein is correlated with development and progression of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 46:21-8.
219. Pan, Z. Q., H. Ge, A. A. Amin, and J. Hurwitz. 1996. Transcription-positive cofactor 4 forms complexes with HSSB (RPA) on single-stranded DNA and influences HSSB-dependent enzymatic synthesis of simian virus 40 DNA. *J Biol Chem* 271:22111-6.
220. Pereira, D. J., D. M. McCarty, and N. Muzyczka. 1997. The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol* 71:1079-88.
221. Pereira, D. J., and N. Muzyczka. 1997. The adeno-associated virus type 2 p40 promoter requires a proximal Sp1 interaction and a p19 CArG-like element to facilitate Rep transactivation. *J Virol* 71:4300-9.

222. Pereira, D. J., and N. Muzyczka. 1997. The cellular transcription factor SP1 and an unknown cellular protein are required to mediate Rep protein activation of the adeno-associated virus p19 promoter. *J Virol* 71:1747-56.
223. Pichler, A., A. Gast, J. S. Seeler, A. Dejean, and F. Melchior. 2002. The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108:109-20.
224. Pickart, C. M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70:503-33.
225. Pickart, C. M., and D. Fushman. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8:610-6.
226. Pommier, Y., P. Pourquier, Y. Fan, and D. Strumberg. 1998. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1400:83-105.
227. Pommier, Y., C. Redon, V. A. Rao, J. A. Seiler, O. Sordet, H. Takemura, S. Antony, L. Meng, Z. Liao, G. Kohlhagen, H. Zhang, and K. W. Kohn. 2003. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutat Res* 532:173-203.
228. Prasad, C. K., C. Meyers, D. J. Zhan, H. You, M. Chiriva-Internati, J. L. Mehta, Y. Liu, and P. L. Hermonat. 2003. The adeno-associated virus major regulatory protein Rep78-c-Jun-DNA motif complex modulates AP-1 activity. *Virology* 314:423-31.
229. Prudden, J., S. Pebernard, G. Raffa, D. A. Slavin, J. J. Perry, J. A. Tainer, C. H. McGowan, and M. N. Boddy. 2007. SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *Embo J* 26:4089-101.
230. Pungalija, P., D. Kulkarni, H. J. Park, H. Marshall, H. Zheng, H. Lackland, A. Saleem, and E. H. Rubin. 2007. TOPORS Functions As A SUMO-1 E3 Ligase for Chromatin-Modifying Proteins. *J Proteome Res* 6:3918-23.
231. Qing, K., J. Hansen, K. A. Weigel-Kelley, M. Tan, S. Zhou, and A. Srivastava. 2001. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular fkbp52 protein in transgene expression. *J Virol* 75:8968-76.
232. Qing, K., C. Mah, J. Hansen, S. Zhou, V. Dwarki, and A. Srivastava. 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2 [see comments]. *Nat Med* 5:71-7.
233. Qing, K., X. S. Wang, D. M. Kube, S. Ponnazhagan, A. Bajpai, and A. Srivastava. 1997. Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10879-84.
234. Qiu, J., and D. J. Pintel. 2002. The adeno-associated virus type 2 Rep protein regulates RNA processing via interaction with the transcription template. *Mol Cell Biol* 22:3639-52.
235. Raj, K., P. Ogston, and P. Beard. 2001. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature* 412:914-7.

236. Rajendra, R., D. Malegaonkar, P. Pungaliya, H. Marshall, Z. Rasheed, J. Brownell, L. F. Liu, S. Lutzker, A. Saleem, and E. H. Rubin. 2004. Topors functions as an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53. *J Biol Chem* 279:36440-4.
237. Rallabhandi, P., K. Hashimoto, Y. Y. Mo, W. T. Beck, P. K. Moitra, and P. D'Arpa. 2002. Sumoylation of topoisomerase I is involved in its partitioning between nucleoli and nucleoplasm and its clearing from nucleoli in response to camptothecin. *J Biol Chem* 277:40020-6.
238. Rangasamy, D., K. Woytek, S. A. Khan, and V. G. Wilson. 2000. SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* 275:37999-8004.
239. Rasheed, Z. A., A. Saleem, Y. Ravee, P. P. Pandolfi, and E. H. Rubin. 2002. The topoisomerase I-binding RING protein, topors, is associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Exp Cell Res* 277:152-60.
240. Rechsteiner, M., and S. W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21:267-71.
241. Redemann, B. E., E. Mendelson, and B. J. Carter. 1989. Adeno-associated virus rep protein synthesis during productive infection. *J Virol* 63:873-82.
242. Rittner, K., R. Heilbronn, J. A. Kleinschmidt, and G. Sczakiel. 1992. Adeno-associated virus type 2-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: involvement of p78rep/p68rep and the HIV-1 long terminal repeat. *J Gen Virol* 73:2977-81.
243. Rodriguez, M. S., C. Dargemont, and R. T. Hay. 2001. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276:12654-9.
244. Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, S. Lain, C. A. Midgley, D. P. Lane, and R. T. Hay. 1999. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* 18:6455-61.
245. Rohwer, N. 2003. Modulation der an der DNA-Replikation des Adeno-assoziierten Virus (AAV) beteiligten enzymatischen Aktivitäten der AAV-Rep-Proteine durch das Rep- und Einzelstrang-DNA bindende Protein PC4. Diplomarbeit. Freie Universität Berlin, Berlin.
246. Rose, J. A., K. I. Berns, M. D. Hoggan, and F. J. Koczot. 1969. Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: formation of a DNA density hybrid on release of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:863-9.
247. Ryan, J. H., S. Zolotukhin, and N. Muzyczka. 1996. Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats. *J Virol* 70:1542-53.
248. Sachdev, S., L. Bruhn, H. Sieber, A. Pichler, F. Melchior, and R. Grosschedl. 2001. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15:3088-103.

249. Saleem, A., J. Dutta, D. Malegaonkar, F. Rasheed, Z. Rasheed, R. Rajendra, H. Marshall, M. Luo, H. Li, and E. H. Rubin. 2004. The topoisomerase I- and p53-binding protein topors is differentially expressed in normal and malignant human tissues and may function as a tumor suppressor. *Oncogene* 23:5293-300.
250. Salomoni, P., and P. P. Pandolfi. 2002. The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108:165-70.
251. Sampson, D. A., M. Wang, and M. J. Matunis. 2001. The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276:21664-9.
252. Samulski, R. J., K. I. Berns, M. Tan, and N. Muzyczka. 1982. Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2077-81.
253. Samulski, R. J., and T. Shenk. 1988. Adenovirus E1B 55-Mr polypeptide facilitates timely cytoplasmic accumulation of adeno-associated virus mRNAs. *J Virol* 62:206-10.
254. Samulski, R. J., A. Srivastava, K. I. Berns, and N. Muzyczka. 1983. Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV. *Cell* 33:135-43.
255. Samulski, R. J., X. Zhu, X. Xiao, J. D. Brook, D. E. Housman, N. Epstein, and L. A. Hunter. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19 [published erratum appears in *EMBO J* 1992 Mar;11(3):1228]. *Embo J* 10:3941-50.
256. Sassone-Corsi, P., J. Visvader, L. Ferland, P. L. Mellon, and I. M. Verma. 1988. Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes Dev* 2:1529-38.
257. Saudan, P., J. Vlach, and P. Beard. 2000. Inhibition of S-phase progression by adeno-associated virus Rep78 protein is mediated by hypophosphorylated pRb. *Embo J* 19:4351-61.
258. Schang, L. M., G. J. Hwang, B. D. Dynlacht, D. W. Speicher, A. Bantly, P. A. Schaffer, A. Shilatifard, H. Ge, and R. Shiekhattar. 2000. Human PC4 is a substrate-specific inhibitor of RNA polymerase II phosphorylation. *J Biol Chem* 275:6071-4.
259. Schlehofer, J. R., M. Ehrbar, and H. zur Hausen. 1986. Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* 152:110-7.
260. Schmidt, D., and S. Muller. 2002. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2872-7.
261. Schmidt, M., J. A. Chiorini, S. Afione, and R. Kotin. 2002. Adeno-associated virus type 2 Rep78 inhibition of PKA and PRKX: fine mapping and analysis of mechanism. *J Virol* 76:1033-42.

262. Schmidt, M., E. Grot, P. Cervenka, S. Wainer, C. Buck, and J. A. Chiorini. 2006. Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *J Virol* 80:5082-5.
263. Schnepf, B. C., R. L. Jensen, C. L. Chen, P. R. Johnson, and K. R. Clark. 2005. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol* 79:14793-803.
264. Secombe, J., and S. M. Parkhurst. 2004. Drosophila Topors is a RING finger-containing protein that functions as a ubiquitin-protein isopeptide ligase for the hairy basic helix-loop-helix repressor protein. *J Biol Chem* 279:17126-33.
265. Seeler, J. S., and A. Dejean. 2003. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:690-9.
266. Senapathy, P., J. D. Tratschin, and B. J. Carter. 1984. Replication of adeno-associated virus DNA. Complementation of naturally occurring rep- mutants by a wild-type genome or an ori- mutant and correction of terminal palindrome deletions. *J Mol Biol* 179:1-20.
267. Shalizi, A., B. Gaudilliere, Z. Yuan, J. Stegmuller, T. Shirogane, Q. Ge, Y. Tan, B. Schulman, J. W. Harper, and A. Bonni. 2006. A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311:1012-7.
268. Shen, T. H., H. K. Lin, P. P. Scaglioni, T. M. Yung, and P. P. Pandolfi. 2006. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24:331-9.
269. Shi, Y., E. Seto, L. S. Chang, and T. Shenk. 1991. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67:377-88.
270. Shinbo, Y., T. Taira, T. Niki, S. M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 2005. DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3. *Int J Oncol* 26:641-8.
271. Smith, R. H., and R. M. Kotin. 2000. An adeno-associated virus (AAV) initiator protein, Rep78, catalyzes the cleavage and ligation of single-stranded AAV ori DNA. *J Virol* 74:3122-9.
272. Smith, R. H., and R. M. Kotin. 1998. The Rep52 gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *J Virol* 72:4874-81.
273. Smith, R. H., A. J. Spano, and R. M. Kotin. 1997. The Rep78 gene product of adeno-associated virus (AAV) self-associates to form a hexameric complex in the presence of AAV ori sequences. *J Virol* 71:4461-71.
274. Srivastava, A., E. W. Lusby, and K. I. Berns. 1983. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45:555-64.
275. Straus, S. E., E. D. Sebring, and J. A. Rose. 1976. Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adenovirus-associated virus DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:742-6.
276. Strumberg, D., A. A. Pilon, M. Smith, R. Hickey, L. Malkas, and Y. Pommier. 2000. Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal

- DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol Cell Biol* 20:3977-87.
277. Su, P. F., S. Y. Chiang, C. W. Wu, and F. Y. Wu. 2000. Adeno-associated virus major Rep78 protein disrupts binding of TATA-binding protein to the p97 promoter of human papillomavirus type 16. *J Virol* 74:2459-65.
278. Summerford, C., J. S. Bartlett, and R. J. Samulski. 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection [see comments]. *Nat Med* 5:78-82.
279. Summerford, C., and R. J. Samulski. 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* 72:1438-45.
280. Sun, H., J. D. Levenson, and T. Hunter. 2007. Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *Embo J* 26:4102-12.
281. Svejstrup, J. Q., K. Christiansen, Gromova, II, A. H. Andersen, and O. Westergaard. 1991. New technique for uncoupling the cleavage and religation reactions of eukaryotic topoisomerase I. The mode of action of camptothecin at a specific recognition site. *J Mol Biol* 222:669-78.
282. Takahashi, Y., V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu, and H. de The. 2004. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* 23:2819-24.
283. Tatham, M. H., Y. Chen, and R. T. Hay. 2003. Role of two residues proximal to the active site of Ubc9 in substrate recognition by the Ubc9.SUMO-1 thiolester complex. *Biochemistry* 42:3168-79.
284. Tatham, M. H., E. Jaffray, O. A. Vaughan, J. M. Desterro, C. H. Botting, J. H. Naismith, and R. T. Hay. 2001. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276:35368-74.
285. Tessier, J., G. Chadeuf, P. Nony, H. Avet-Loiseau, P. Moullier, and A. Salvetti. 2001. Characterization of adenovirus-induced inverted terminal repeat-independent amplification of integrated adeno-associated virus rep-cap sequences [In Process Citation]. *J Virol* 75:375-83.
286. Tratschin, J. D., I. L. Miller, and B. J. Carter. 1984. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* 51:611-9.
287. Tratschin, J. D., J. Tal, and B. J. Carter. 1986. Negative and positive regulation in trans of gene expression from adeno-associated virus vectors in mammalian cells by a viral rep gene product. *Mol Cell Biol* 6:2884-94.
288. Trempe, J. P., and B. J. Carter. 1988. Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *J Virol* 62:3356-63.
289. Trempe, J. P., and B. J. Carter. 1988. Regulation of adeno-associated virus gene expression in 293 cells: control of mRNA abundance and translation. *J Virol* 62:68-74.

290. Urabe, M., Y. Hasumi, A. Kume, R. T. Surosky, G. J. Kurtzman, K. Tobita, and K. Ozawa. 1999. Charged-to-alanine scanning mutagenesis of the N-terminal half of adeno-associated virus type 2 Rep78 protein. *J Virol* 73:2682-93.
291. Uzunova, K., K. Gottsche, M. Miteva, S. R. Weisshaar, C. Glanemann, M. Schnellhardt, M. Niessen, H. Scheel, K. Hofmann, E. S. Johnson, G. J. Praefcke, and R. J. Dohmen. 2007. Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J Biol Chem*.
292. von Mikecz, A., S. Zhang, M. Montminy, E. M. Tan, and P. Hemmerich. 2000. CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *J Cell Biol* 150:265-73.
293. Vousden, K. H. 2005. Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science* 309:1685-6.
294. Walker, S. L., R. S. Wonderling, and R. A. Owens. 1997. Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 Rep68 protein helicase motifs. *J Virol* 71:6996-7004.
295. Walz, C., A. Deprez, T. Dupressoir, M. Durst, M. Rabreau, and J. R. Schlehofer. 1997. Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* 78:1441-52.
296. Walz, C., and J. R. Schlehofer. 1992. Modification of some biological properties of HeLa cells containing adeno-associated virus DNA integrated into chromosome 17. *J Virol* 66:2990-3002.
297. Walz, C., J. R. Schlehofer, M. Flentje, V. Rudat, and H. zur Hausen. 1992. Adeno-associated virus sensitizes HeLa cell tumors to gamma rays. *J Virol* 66:5651-7.
298. Wang, J., C. Shiels, P. Sasieni, P. J. Wu, S. A. Islam, P. S. Freemont, and D. Sheer. 2004. Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J Cell Biol* 164:515-26.
299. Wang, J. C. 1996. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65:635-92.
300. Wang, J. Y., A. H. Sarker, P. K. Cooper, and M. R. Volkert. 2004. The single-strand DNA binding activity of human PC4 prevents mutagenesis and killing by oxidative DNA damage. *Mol Cell Biol* 24:6084-93.
301. Wang, X. S., S. Ponnazhagan, and A. Srivastava. 1996. Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *J Virol* 70:1668-77.
302. Wang, X. S., and A. Srivastava. 1997. A novel terminal resolution-like site in the adeno-associated virus type 2 genome. *J Virol* 71:1140-6.
303. Wang, X. S., and A. Srivastava. 1998. Rescue and autonomous replication of adeno-associated virus type 2 genomes containing Rep-binding site mutations in the viral p5 promoter. *J Virol* 72:4811-8.
304. Wang, Z., and R. G. Roeder. 1998. DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell* 1:749-57.



305. Ward, P., F. B. Dean, M. E. O'Donnell, and K. I. Berns. 1998. Role of the adenovirus DNA-binding protein in in vitro adeno-associated virus DNA replication. *J Virol* 72:420-7.
306. Weger, S., E. Hammer, and M. Engstler. 2003. The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation. *Exp Cell Res* 290:13-27.
307. Weger, S., E. Hammer, and R. Heilbronn. 2002. Topors, a p53 and topoisomerase I binding protein, interacts with the adeno-associated virus (AAV-2) Rep78/68 proteins and enhances AAV-2 gene expression. *J Gen Virol* 83:511-6.
308. Weindler, F. W., and R. Heilbronn. 1991. A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication. *J Virol* 65:2476-83.
309. Weitzman, M. D., K. J. Fisher, and J. M. Wilson. 1996. Recruitment of wild-type and recombinant adeno-associated virus into adenovirus replication centers. *J Virol* 70:1845-54.
310. Weitzman, M. D., S. R. Kyostio, B. J. Carter, and R. A. Owens. 1996. Interaction of wild-type and mutant adeno-associated virus (AAV) Rep proteins on AAV hairpin DNA. *J Virol* 70:2440-8.
311. Werten, S., F. W. Langen, R. van Schaik, H. T. Timmers, M. Meisterernst, and P. C. van der Vliet. 1998. High-affinity DNA binding by the C-terminal domain of the transcriptional coactivator PC4 requires simultaneous interaction with two opposing unpaired strands and results in helix destabilization. *J Mol Biol* 276:367-77.
312. Werten, S., G. Stelzer, A. Goppelt, F. M. Langen, P. Gros, H. T. Timmers, P. C. Van der Vliet, and M. Meisterernst. 1998. Interaction of PC4 with melted DNA inhibits transcription. *Embo J* 17:5103-11.
313. West, M. H., J. P. Trempe, J. D. Tratschin, and B. J. Carter. 1987. Gene expression in adeno-associated virus vectors: the effects of chimeric mRNA structure, helper virus, and adenovirus VA1 RNA. *Virology* 160:38-47.
314. Westphal, J. 2006. Untersuchungen zur Rolle des transkriptionellen Coaktivators PC4 bei der Genexpression und DNA-Replikation des Adeno-assozierten Virus (AAV-2) durch Modulation der endogenen PC4-Funktion und Überexpression der DNA-Bindungsdomäne von PC4. Diplomarbeit. Freie Universität Berlin, Berlin.
315. Wieland, I., M. Bohm, K. C. Arden, T. Ammermuller, S. Bogatz, C. S. Viars, and M. F. Rajewsky. 1996. Allelic deletion mapping on chromosome 5 in human carcinomas. *Oncogene* 12:97-102.
316. Winocour, E., M. F. Callaham, and E. Huberman. 1988. Perturbation of the cell cycle by adeno-associated virus. *Virology* 167:393-9.

317. Winocour, E., L. Puzis, S. Etkin, T. Koch, B. Danovitch, E. Mendelson, E. Shaulian, S. Karby, and S. Lavi. 1992. Modulation of the cellular phenotype by integrated adeno-associated virus. *Virology* 190:316-29.
318. Wistuba, A., A. Kern, S. Weger, D. Grimm, and J. A. Kleinschmidt. 1997. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *J Virol* 71:1341-52.
319. Wistuba, A., S. Weger, A. Kern, and J. A. Kleinschmidt. 1995. Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *J Virol* 69:5311-9.
320. Wonderling, R. S., S. R. Kyostio, and R. A. Owens. 1995. A maltose-binding protein/adeno-associated virus Rep68 fusion protein has DNA-RNA helicase and ATPase activities. *J Virol* 69:3542-8.
321. Wu, J., M. D. Davis, and R. A. Owens. 1999. Factors affecting the terminal resolution site endonuclease, helicase, and ATPase activities of adeno-associated virus type 2 Rep proteins. *J Virol* 73:8235-44.
322. Xiao, W., N. Chirmule, S. C. Berta, B. McCullough, G. Gao, and J. M. Wilson. 1999. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 73:3994-4003.
323. Xie, Q., W. Bu, S. Bhatia, J. Hare, T. Somasundaram, A. Azzi, and M. S. Chapman. 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10405-10.
324. Xie, Y., O. Kerscher, M. B. Kroetz, H. F. McConchie, P. Sung, and M. Hochstrasser. 2007. The yeast HEX3-SLX8 heterodimer is a ubiquitin ligase stimulated by substrate sumoylation. *J Biol Chem*.
325. Yakobson, B., T. A. Hrynko, M. J. Peak, and E. Winocour. 1989. Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm. *J Virol* 63:1023-30.
326. Yakobson, B., T. Koch, and E. Winocour. 1987. Replication of adeno-associated virus in synchronized cells without the addition of a helper virus. *J Virol* 61:972-81.
327. Yalkinoglu, A. O., H. Zentgraf, and U. Hubscher. 1991. Origin of adeno-associated virus DNA replication is a target of carcinogen-inducible DNA amplification. *J Virol* 65:3175-84.
328. Yang, C. C., X. Xiao, X. Zhu, D. C. Ansardi, N. D. Epstein, M. R. Frey, A. G. Matera, and R. J. Samulski. 1997. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol* 71:9231-47.
329. Yang, M., C. T. Hsu, C. Y. Ting, L. F. Liu, and J. Hwang. 2006. Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. *J Biol Chem* 281:8264-74.
330. Yang, Q., F. Chen, J. Ross, and J. P. Trempe. 1995. Inhibition of cellular and SV40 DNA replication by the adeno-associated virus Rep proteins. *Virology* 207:246-50.
331. Yang, Q., F. Chen, and J. P. Trempe. 1994. Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol* 68:4847-56.

332. Yang, Q., A. Kadam, and J. P. Trempe. 1992. Mutational analysis of the adeno-associated virus rep gene. *J Virol* 66:6058-69.
333. Yang, X. J., and S. Gregoire. 2006. A recurrent phospho-sumoyl switch in transcriptional repression and beyond. *Mol Cell* 23:779-86.
334. Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk, and M. B. Roth. 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev* 6:837-47.
335. Zhan, D., A. D. Santin, Y. Liu, G. P. Parham, C. Li, C. Meyers, and P. L. Hermonat. 1999. Binding of the human papillomavirus type 16 p97 promoter by the adeno-associated virus Rep78 major regulatory protein correlates with inhibition. *J Biol Chem* 274:31619-24.
336. Zhang, H., J. C. Wang, and L. F. Liu. 1988. Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1060-4.
337. Zhang, H. F., A. Tomida, R. Koshimizu, Y. Ogiso, S. Lei, and T. Tsuruo. 2004. Cullin 3 promotes proteasomal degradation of the topoisomerase I-DNA covalent complex. *Cancer Res* 64:1114-21.
338. Zhao, J. 2007. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci*.
339. Zhong, L., Y. Wang, P. Kannan, and M. A. Tainsky. 2003. Functional characterization of the interacting domains of the positive coactivator PC4 with the transcription factor AP-2alpha. *Gene* 320:155-64.
340. Zhong, S., S. Muller, S. Ronchetti, P. S. Freemont, A. Dejean, and P. P. Pandolfi. 2000. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95:2748-52.
341. Zhong, S., P. Salomoni, and P. P. Pandolfi. 2000. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2:E85-90.
342. Zhou, J., K. Ren, X. Liu, X. Xiong, X. Hu, and J. Zhang. 2005. A novel PDIP1-related protein, KCTD10, that interacts with proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase delta. *Biochim Biophys Acta* 1729:200-3.
343. Zhou, R., H. Wen, and S. Z. Ao. 1999. Identification of a novel gene encoding a p53-associated protein. *Gene* 235:93-101.
344. Zolotukhin, S., B. J. Byrne, E. Mason, I. Zolotukhin, M. Potter, K. Chesnut, C. Summerford, R. J. Samulski, and N. Muzyczka. 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6:973-85.

## ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 20.11.2007



.....  
Unterschrift