Abortive Infektion von Hamsterzellen mit menschlichem Adenovirus Typ 12:

Untersuchungen zur frühen Infektionsphase und Komplementierung des DNA-Replikationsblockes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Dennis Webb
aus Berlin

Köln im Mai 2004

Berichterstatter: Prof. Dr. Walter Doerfler
Prof. Dr. Jens C. Brüning
Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juli 2004

Lisa Katharina
Marianna
Meiner Mutter

„Um ein tadelloses Mitglied einer Schafherde sein zu können, muß man vor allem ein Schaf sein.“

Albert Einstein - Deutscher Physiker

1879-1955

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis VI

Tabellenverzeichnis VII

Abkürzungsvereichnis VIII

A. Einleitung

A.1 Allgemeine Einleitung 1
A.2 Das adenovirale System 2
A.3 Frühe Struktur der adenoviralen Infektionsphase 3
A.4 Die adenovirale DNA-Replikation 4
A.5 Abortive Infektion von Adenovirus Typ 12 in BHK21 Zellen 7
A.6 Das präterminale und das terminale Protein der Adenoviren 10
A.7 Der menschliche CAR-Rezeptor 11
A.8 Zielsetzung der Arbeit 15

B. Material

B.1 Chemikalien 16
B.2 Sonstiges Labormaterial 20
B.3 Zentrifugen 25
B.4 Enzyme 26
B.5 Grössenstandards 27
B.6 Radioisotope 27
B.7 Zellinien 27
B.8 Bakterienstämme 28
B.9 Plasmide 28
B.10 Primer 28
B.10.1 Primer zur Sequenzierung 28
B.10.2 Primer zur hCAR Vektorklonierung 28
B.10.3 Primer zur quanitativen PCR zur Detektion importierter viraler DNA 29
B.10.4 Primer zur Quantifizierung der RNA Transkriptionslevel 29
B.10.5 Primer zur Klonierung einzelsträngiger Ad12 Gensequenzen 29
B.11 Antikörper 31
B.12 Puffer und Lösungen 31

C. Methoden

C.1 Zellkultur

C.1.1 Passage von Zellen

C.1.1.1 Passage von Zellkulturen in Gewebekulturflaschen 38

C.1.1.2 Passage von Suspensionskulturen 38

C.1.2 Zellernte 39

C.2 Virusproduktion

C.2.1 Inokulation von Zellen mit Viren 39

C.2.1.1 Inokulation adhärent wachsender Zellen in Gewebekulturflaschen 39

C.2.1.2 Inokulation von Suspensionskulturen 39

C.2.2 Virusernte

C.2.2.1 Virusernte aus Gewebekulturflaschen 40

C.2.2.2 Virusernte aus Suspensionskulturen 40

C.2.3 Virusreinigung 40

C.2.4 Bestimmung der Viruskonzentration 41

C.2.5 Virus-DNA Präparation 41

C.2.5.1 Öffnen der Virionen 41

C.3 DNA-Präparation aus Eukaryontenzellen 41

C.3.1 DNA-Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion 42

C.3.2 DNA-Präzipitation 42

C.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA mittels Messung der optischen Dichte (OD) 42

C.4 DNA-Analysen

C.4.1 Restriktionsanalyse 43

C.4.2 Gelelektrophorese und DNA-Visualisierung 43

C.4.3 Southern Transfer Analyse 43

C.4.4 Hybridisierung membrangebundener DNA-Fragmente 44

C.4.5 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde 44

C.4.6 Polymerasekettenreaktion 45

C.4.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel 45

C.4.8 DNA Sequenzanalyse 46

C.5 RNA Analysen

C.5.1 RNA-Präparation mittels RNeasy-Kit 46

C.5.2 DNAse-Behandlung von RNA-Proben 46

C.5.3 RNA-Visualisierung 47
C.5.4 RT-PCR 47
C.5.5 quantitative RT-PCR 48
C.5.6 Präparation eines nativen Polyacrylamidgels 49
C.6 Proteinanalysen
C.6.1 Proteinextraktion aus Eukaryonten 50
C.6.2 Bradford-Assay – Bestimmung der Proteinkonzentration 50
C.6.3 Erhöhung einer Proteinkonzentration („Acetonfällung“) 50
C.6.4 Trennung eines Proteingemisches durch SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 51
C.6.4.1 Gelpräparation 51
C.6.4.2 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran 52
C.6.4.3 Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper 52
C.6.4.4 ECL-Lichtreaktion 53
C.7 Klonierungstechniken
C.7.1 PCR-Amplifikation des menschlichen CAR-Rezeptor Gens 53
C.7.2 Klonierung des PCR-Fragmentes in den Expressionsvektor 53
C.7.2.1 Restriktion der PCR-Fragmente und des Vektors 53
C.7.2.2 Ligation 54
C.7.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen 54
C.7.4 Elektroporation / Transformation 55
C.7.5 Kochlyse und Restriktionskontrolle 55
C.8 Immunfluoreszenzfärbung 56
C.9 Detektion neusynthetisierter adenoviraler DNA 57
C.9.1 Transfektion des menschlichen CAR-Rezeptors in BHK21 Zellen 57
C.9.2 BrdU Markierung replizierender DNA 57
C.9.3 Alkalischer Sucrosegradient 57
C.9.4 Detektion von BrdU inkorporierter DNA durch Anti-BrdU-Antikörper 58
C.10 Einzelsträngige DNA Arrays 58
C.11 Nukleinsäurequantifizierung mit Roches LightCycler 59
C.11.1 Quantitative PCR 60
C.11.2 Quantitative „two step“ RT-PCR 61
C.12 ImmunoFISH 63
C.12.1 Fluoreszensmarkierung der DNA 63

C.12.2 Präparation und Färbung der Proteine und der DNA 63

C.13 Immunopräzipitation von intrazellulärer Ad12 DNA mittels Ad12-pTP Antiserum 64

C.14 Plaque Test 65

D. Ergebnisse

D.1 Allgemeine Infektionen des Adenovirus Typ 12 66

D.2 Arrayanalyse früher Ad12 viraler Transkription 67

D.3 Expression von E1A und pTP in Ad12 infizierten Zellen 71

D.4 Transfektion des Ad12 E1A in BHK21 Zellen 73

D.5 Ad12 virale DNA Replikation in BHK21 Zellen 74

D.6 *De novo* Synthese Ad12 viraler DNA in Ad12-E1A, Ad2-E1A oder Ad12 pTP transfizierten BHK21 Zellen 76

D.7 Expression später viraler Gene 80

D.8 Ad12 Adsorption an und Penetration in menschlichen HeLa und BHK21 Hamsterzellen 81

D.9 Viraler DNA Import in den Zellkern von produktiv und abortiv infizierten Zellen 82

D.10 Analyse intranukleärer viraler DNA in Ad2- oder Ad12-infizierten HeLa oder BHK21 Zellen während der ersten 24 h p.i. 84

D.11 CAR Expression in menschlichen und Hamsterzellen 85

D.12 Transfektion des menschlichen CAR in BHK21 Zellen 86

D.13 *De novo* Synthese Ad12 viraler DNA in hCAR transfizierten BHK21 Zellen 88

D.14 Transkriptionsanalyse einiger früher und später Ad12 Gene 90

D.15 Expression des späten Ad12 Fiberproteins in hCAR exprimierenden Hamsterzellen 93

E. Diskussion 95

F. Zusammenfassung 100

G. Literaturverzeichnis 103

H. Anhang

H.1 Kurzzusammenfassung 116
H.2 Abstract 117
H.3 Lebenslauf 118
H.4 Erklärung 119

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Zeichnung eines Adenovirus Partikels in der aktuell bekannten Architektur.	2
Abb. 2	Der adenovirale Startpunkt der Replikation.	5
Abb. 3	Schematische Darstellung der „Pfannenstielbildung“.	7
Abb. 4	Schematische Abbildung des menschlichen CAR Proteins und seiner zwei Isostrukturen.	12
Abb. 5	Detektion von Ad12 Replikationszentren.	67
Abb. 6a	Transkriptionsmuster von Ad12 Genen in produktiv infizierten menschlichen HeLa Zellen.	68
Abb. 6b	Transkriptionsmuster von Ad12 Genen in abortiv infizierten BHK21 Hamsterzellen.	70
Abb. 7a	E1A Expression in Ad12-infizierten menschlichen Zellen oder Hamsterzellen.	71
Abb. 7b	Synthese des pTP und TP in Ad12-infizierten BHK21, C131 oder HeLa Zellen.	72
Abb. 8	Überexpression von Ad12 E1A oder Ad12 pTP in BHK21 Hamsterzellen.	74
Abb. 9	DNA Analysen durch Southern Transfer von unterschiedlich behandelten Zellen zum Nachweis von Ad12 DNA.	75
Abb. 10	Replikation von kompletter Ad12 DNA in BHK21 Zellen, welche mit dem Ad12 pTP, Ad12 E1A oder Ad2 E1A Konstrukt transfiziert wurden.	77
Abb. 11	Identifikation von Ad12 DNA in den Peakfraktionen.	78
Abb. 12	Immunopräzipitation von Ad12 DNA mittels eines anti-Ad12 pTP Serums.	79
Abb. 13	Translation des späten Fiberproteins in menschlichen Zellen und in Hamsterzellen.	80
Abb. 14	Adsorption von Ad12 an HeLa und BHK21 Zellen.	81
Abb. 15	Quantitative Analyse des Imports von Adenovirus DNA in die Kerne von permissiven und nicht permissiven Zellen.	83
Abb. 16	Quantifizierung von Ad2 oder Ad12 DNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion.	84
Abb. 17	Expression des CAR Rezeptors in HeLa und BHK21 Zellen.	85
Abb. 18	Quantifizierung hCAR spezifischer Transkripte in HeLa und hCAR-transfizierten BHK21 Zellen.	87
Abb. 19	Relative quantitative PCR Analyse von naïven oder hCAR-transfizierten und Ad2 oder Ad12 infizierten BHK21 Zellen.	87

Abb. 20	Replikation von Ad12 DNA.	88
Abb. 21	Analyse der Gradienten-Peakfraktionen durch Southern Transfer.	89
Abb. 22	Zeitlicher Verlauf der Ad12 DNA Replikation in hCAR-transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen.	90
Abb. 23	Kontrolle amplifizierter Fragmente der LightCycler Methode.	92
Abb. 24	Erhöhte Expression von Ad12 Genen in hCAR transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen.	93
Abb. 25	Expression des späten Ad12 Fiberproteins in Ad12 infizierten hCAR exprimierenden BHK21 Zellen.	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Vergleiche der viralen Genexpression in Ad12 infizierten HeLa, BHK21 und hCAR transfizierten BHK21 Zellen.	91

Abkürzungsverzeichnis

Es gelten die SI-Einheiten und die daraus ableitbaren zusammengesetzten Größen.

Abb.	Abbildung
Ad2	Adenovirus Typ 2
Ad5	Adenovirus Typ 5
Ad12	Adenovirus Typ 12
bp	Basenpaare
c	Zenti-
cDNA	complementary DNA (engl. komplementäre DNA)
CPE	cytophatischer Effekt
Ci	Curie
dATP	Desoxyadenin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanin-5'-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	double strand (engl. Doppelstrang)
E. coli	Escherichia coli
eGFP	enhanced Green Fluorescense Protein (engl. optimiertes grün-fluoreszierendes Protein)
Et al.	Et alii (und andere)
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
h p.i.	hours post infection (engl. Stunden nach der Infektion)
h p.m.i.	hours post mock infection (engl. Stunden nach der mock Infektion)
k	Kilo-
kbp	Kilobasenpaare
µ	Mikro-
m	Milli-
min	Minute
mRNA	messenger RNA (engl. Boten-RNA)
n	Nano-

ORF	Open Reading Frame (engl. offener Leseraster)
p	Pico-
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl. Polymerase Kettenreaktion)
Pfu	Plaque forming units (engl. infektiöse Einheiten)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
ss	single strand (engl. Einzelstrang)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

A. Einleitung

1. Allgemeine Einleitung

Alles Lebendige dieser Erde, auf der wir uns befinden, vermehrt sich. Dabei gehen zwar Komplexität und Grösse der Organismen sehr weit auseinander, jedoch ist der zentrale Vermehrungsmechanismus bei allen Lebewesen grundsätzlich der Gleiche. Die Nukleinsäuren sind der Schlüssel des Lebens, den alle Erdbewohner auf eine mehr oder weniger ähnliche Weise nutzen, um alle Informationen zum „Bau“ ihrer Nachkömmlinge zu speichern. Jedoch nicht jeder Nutzer der DNA (Desoxyribonukleinsäure) als Erbanlage verfügt über einen eigenen Stoffwechsel. Viren zum Beispiel nutzen zwar DNA oder auch RNA (Ribonukleinsäure) zur Codierung all ihrer Bestandteile für Nachkommen, bedürfen aber für ihre Replikation des Stoffwechsels und der Enzyme von Wirtszellen, die sie infizieren. Nicht jede Infektion von Viren in Zellen ist jedoch gleich einer anderen. Virale Infektionen von Wirtszellen sind charakterisiert durch eindeutige und zwingende Abläufe: die Adsorption an und Penetration in die spezifische Wirtszelle vermittelt durch Zelloberflächenrezeptoren, Transport zum Replikationsort, Entledigung von Hüllproteinen, Genomreplikation und Expression neuer Strukturproteine, sowie deren Zusammenbau zu neuen infektiösen Partikeln. Auch können nicht alle Zellen oder Gewebe durch jedes Virus infiziert werden, hauptsächlich, weil jedes Virus unterschiedliche zelluläre Faktoren und Maschinerien zur Virionenproduktion benötigt.

Virusinfektionen können systemspezifisch, also je nach Virus-Wirtsinteraktion, sehr unterschiedlich verlaufen. Wird eine Zelle produktiv von einem Virus infiziert, so ist das Resultat eine vollständige Replikation der infektiösen Partikel. Eine abortive Infektion führt zwar zur Synthese einiger, jedoch nicht aller viraler Genprodukte, und es können dann keine infektiösen Tochtervirionen gebildet werden. Bei latenten Infektionen ist das Virus morphologisch nicht mehr in der Zell nachweisbar, wohl aber die virale Erbinformation, die nicht oder nur partiell exprimiert wird. Zur Virusvermehrung kommt es dabei zunächst nicht, grundsätzlich kann das Virus aber reaktiviert werden.

Die relativ kleinen und überschaubaren Viren mit ihrer zumeist geringen Anzahl an Genen und doch vielfältigen aber spezifischen Möglichkeiten zu Interaktionen mit ihren Wirtszellen, machen diese infektiösen Einheiten zu interessanten Objekten für der Basisforschung in der Wissenschaft. Dabei führen Viren in einigen Fällen nur ein Minimum an Enzymen mit sich,

so dass alles zusätzlich Benötigte effektiv rekrutiert werden muss. Ausserdem müssen Viren der Immunantwort des Wirtsorganismus entkommen. Die komplexe Funktionsweise dieser einfach gebauten Viren, die Fähigkeit schnellstmöglich die eigene Erbinformation zu replizieren und sich zu vermehren, reflektiert eine Anpassungsfähigkeit an Zellen höherer Lebewesen, die sich seit Beginn der Evolution, wahrscheinlich mit den Wirtszellen entwickelt hat.

2. Das adenovirale System

1953 isolierten W.P. Rowe und Mitarbeiter (Rowe et al., 1953) und unabhängig von ihnen auch Hillemann et al. (1954), die ersten Adenoviren aus menschlichen Tonsillen und adenoidem Gewebe. Adenoviren infizieren in erster Linie Menschen sowie viele andere Säugetiere und Vögel. Sie verursachen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, rufen aber auch milde Infektionen des Gastrointestinaltraktes sowie der Bindehaut des Auges hervor. Derzeit sind 51 menschliche Adenovirussubtypen bekannt (Index Virum, Stand 2002). Adenoviren können in Nagetieren Tumore induzieren. Daraus erfolgte eine Einteilung der Viren nach ihrem oncogenen Potential in die Gruppen A bis E, wobei A die Gruppe mit höchster Tumorbildungsrate bildet. In einer zusätzlichen Gruppe F fasst man alle Adenoviren mit unbekanntem Tumorpotential zusammen.

Adenoviren zeichnen sich durch ein ikosaedrisches Capsid ohne Lipidhülle aus, das im Durchmesser je nach Subtyp zwischen 80-90 nm variiert (Abb. 1). Das Capsid besteht aus 240 Hexon- und 12 Pentoncapsomeren. Jedes Penton ist an den Ecken des icosaedrischen Partikels lokalisiert und bildet die Basis für je ein nach aussen ragendes Fiberprotein. Der aminoterminale Teil des Fiberproteins ist in die Pentonbasis eingelassen, der Carboxyterminus wird von dem Knobprotein geformt, das die Virusbindung an die Wirtszelle einleitet. Hexon-Hexon Bindungen werden durch die assoziierten Proteine IX und IIIa stabilisiert. Ein Ring von

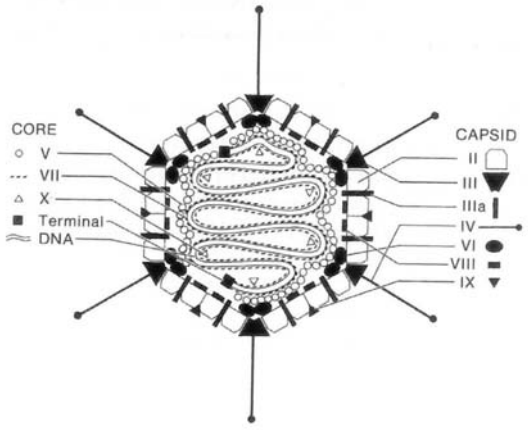


Abb. 1:
Schematische Zeichnung eines Adenovirus Partikels in der aktuell bekannten Architektur (entnommen aus Stewart und Burnett, 1993).

Hexons, welche die Pentons umranden (peripentonale Hexons) interagieren mit den Polypeptiden VI und VIII. Genauere Einsichten in die Adenostruktur werden in Burnett et al. (1997, structural biology of viruses) beschrieben.

Der adenovirale Kern besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA einer Basenpaarlänge von 32-36 Kilobasenpaaren und den fünf viral enkodierten Proteinen V, VII, mu, der viralen Protease und dem terminalen Protein (TP). Das Protein VII besitzt histonähnliche Funktion und kondensiert virale DNA (Mirza und Weber, 1982, Structure of adenovirus chromatin). Das TP ist eine Besonderheit der adenoviralen DNA und ist kovalent am 5'-Ende beider Stränge gebunden.

3. Frühe Struktur der adenoviralen Infektionphase

Die Adsorption an und die Penetration in die Zielzellen, ebenso wie der gesamte Infektionsverlauf von Adenoviren, unterliegt einer strengen zeitlichen Regulation. Ganz zu Beginn bindet das Knobprotein des Fiberproteins an den CAR (Coxackievirus und Adenovirus Rezeptor), der zur Familie der MHC-I Immunglobuline zählt. Gut charakterisiert ist die Internalisierung von Adenovirus Typ 2 (Ad2). Konservierte RGD-Motive des Pentonproteins erkennen zusätzlich die heterodimären Membrankomponenten $\alpha_v\beta3$ und $\alpha_v\beta5$ (Bai et al., 1993; Felding-Habermann et al., 1992; Wickham et al., 1993). Die letztendlich ausschlaggebende und für die Adenovirus Internalisierung verantwortlichen Domänen der Virus-Wirts-Interaktion sind bis heute nicht bekannt, genauere Einzelheiten werden in Abschnitt 6. der Einleitung behandelt. Tatsache ist jedoch, dass die Länge des Fibershaftes bei unterschiedlichen Adenovirussubtypen zwischen 12 und 13 nm variiert. (Norrby und Skaaret, 1967; Norrby, 1969; Norrby und Ankerst, 1969; Chraboczek et al., 1995; Devaux et al., 1987; Ruigrok et al., 1990; Steven et al., 1997). Letztlich kommt die Frage auf, welchen nutzen die Fiber-Rezeptorbindung tatsächlich hat und man vermutet, dass mit Hilfe dieser Interaktion die Pentonbasis näher an die Internalisierungsintegrine herangebracht wird.

Adenoviren werden über sog. „coated pits" endozytiert und bereits 5 bis 10 Minuten später wird das Virion in das Cytosol entlassen. (Chardonnet und Dales, 1970a, 1970b; Fitzgerald et al., 1983; Varga et al., 1991). Der Mechanismus zur Freisetzung des Virions ist jedoch letztlich nicht ganz geklärt. Man hat bisher angenommen, dass ein niedriger endosomaler pH-Wert der Auslöser zur Vesikellysis wäre (Seth et al., 1984, Svensson 1985; Patan et al., 1986; Prchla et al., 1995). Neuere Untersuchungen aber haben gezeigt, dass vielmehr die räumliche

Stellung viraler Proteine zu Wirtsmolekülen von Bedeutung ist (Rodriguez und Everitt, 1996). Letztlich brechen die Vesikel an den Kontaktstellen zu den Knobproteinen auf, das Virion verliert dabei die Fiberproteine sowie die Pentonbasen und das Virus wird in das Cytosol entlassen. Anschliessend bindet sich das Partikel über die Hexonproteine an Mikrotubuli (Luftig und Weihing, 1975; Chardonnet und Dales, 1970a, 1970b) und wird zu den Kernporen transportiert.

Der Zerfall der Virionen wird durch die im Capsid mitgeführte L3/p23 Cysteinprotease vermittelt (Weber 1976; Mirza und Weber, 1979; Cotten und Weber, 1995). Die Protease degradiert im Folgenden das Protein XI, welches die Hexon-Hexon-Interaktion stabilisiert, sowie das Protein VI, welches auf der einen Seite mit den peripentonalen Hexons und auf der anderen mit dem Capsidkern assoziiert ist (Greber et al., 1993; Greber et al., 1996). Adenovirusmutanten (z.B. Ad2 *ts1*) mit einer defekten Protease und nicht prozessierten Proteinen im Virion können nicht mir einer produktiven Infektion fortfahren. (Cotten und Weber,1995; Greber et al., 1996). Wie weit die Umstrukturierung des viralen Capsids bei diesen Schritten geht ist nicht klar, jedoch sind morphologisch detektierbare Partikel elektronenmikroskopisch an den Kernporen zu finden. (Morgan et al., 1969; Greber et al., 1996). Der teilweise Zerfall der Virionen könnte auch vielerlei verdeckt liegende Signale für das Einschleusen der DNA in den Zellkern freilegen.

Alles in allem können Virionen binnen 40 min nach der Endozytose in der Nähe des Zellkerns nachgewiesen werden (Greber et al., 1993). Wie die adenovirale DNA schliesslich in den Zellkern durch die Kernporen eingeschleust wird, ist bisher nicht gut verstanden, könnte aber über die Kernlokalisierungssequenz des kovalent an die DNA gebundenen TPs vollzogen werden. Es werden drei Möglichkeiten des viralen DNA Imports in die Zellkerne von Säugetierzellen vorgeschlagen (Trotman et al., 2001; Trotman et al., 2003; Greber und Fassati, 2003): (i) ein zuletzt übrig gebliebener genomischer Komplex wird durch die Kernporen geschleust, (ii) ein nahezu dissoziiertes Viruspartikel bindet an die Kernpore und die virale DNA wird in den Kern injiziert, (iii) Importfaktoren werden zum subviralen Partikel rekrutiert und vermitteln den Kernimport.

4. Die adenovirale DNA-Replikation

Mit Ankunft der adenoviralen DNA im Zellkern werden die ersten Proteine exprimiert. Die zunächst wichtigsten zu transkribierenden Gene liegen in der E1 Region und dort vor allem

die Proteine der E1A Region. Diese sind Transkriptionsregulatoren aller viralen Promotoren sowie einiger spezifischer zellulärer Gene. Interessanterweise haben die E1 Proteine keinerlei DNA-Bindedomänen. Vielmehr interagieren sie mit zellulären Faktoren und rekrutieren sie zur Bindung an stromaufwärts gelegene Promotoren, Verstärkerelemente, Co-Faktoren und regulatorische Proteine, welche ihrerseits wieder die Kontrolle über DNA bindende Elemente besitzen (Egan et al., 1988; Whyte et al., 1988a, 1988b, 1989; Giordano et al., 1991a, 1991b; Faha et al., 1992; Jelasma et al., 1989; Harlow et al 1986; Yee und Branton, 1985; Übersicht in Swaminathan und Thimmapaya, 1995). Alle zur viralen DNA-Replikation benötigten Proteine sind in der E2-Region gelegen. Für deren Transkription und Expression müssen ebenfalls zelluläre Faktoren durch E1A Proteine rekrutiert werden (Liu und Green, 1990; Lee et al., 1991; Nevins et al., 1992). In der E2 Region liegen codiert das präterminale Protein (pTP), die adenovirale DNA-Polymerase (AdPol) sowie das DNA bindende Protein (DBP), wobei pTP und AdPol in der infizierten Zelle als Heterodimer vorkommen (Lichy et al., 1982). Wie bereits erwähnt, liegt die adenovirale DNA doppel-strängig, linear und mit dem an beiden 5'-Enden kovalent gebundenen TP vor. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Adenovirus DNA sind die an beiden DNA Enden liegenden invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (engl.: **i**nverted **t**erminal **r**epeats = ITR), die je nach Virussubtyp zwischen 20 und 161 bp lang sein können. In den ITRs liegt ebenfalls die Sequenz der sogenannten Kernregion (engl. core region) (Abb. 2).

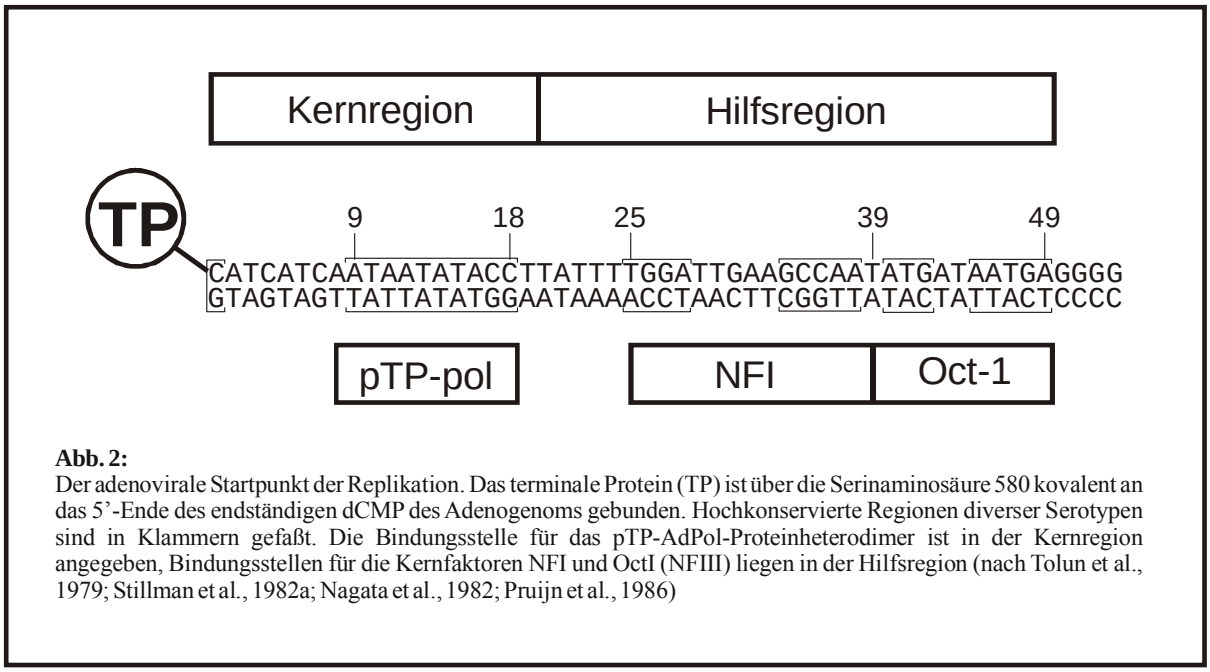


Abb. 2:
Der adenovirale Startpunkt der Replikation. Das terminale Protein (TP) ist über die Serinaminosäure 580 kovalent an das 5'-Ende des endständigen dCMP des Adenogenoms gebunden. Hochkonservierte Regionen diverser Serotypen sind in Klammern gefaßt. Die Bindungsstelle für das pTP-AdPol-Proteinheterodimer ist in der Kernregion angegeben, Bindungsstellen für die Kernfaktoren NFI und OctI (NFIII) liegen in der Hilfsregion (nach Tolun et al., 1979; Stillman et al., 1982a; Nagata et al., 1982; Pruijn et al., 1986)

Die Kernregion des Ursprungs der Ad DNA Replikation, zusammen mit der Hilfsregion (Bindestellen für NFI und NFIII) bilden den sogenannten *ori* (engl. **ori**gin of replication). Allein die Kernregion sowie die Präsenz der drei E2 codierten Proteine kann bereits eine schwache virale DNA Replikation weniger Nukleotide *in vitro* einleiten (Chowrira et al., 1991). Für eine effiziente und starke Replikation werden noch die zellulären Kernfaktoren I, II und III (engl. nuclear factor = NFI, NFII, NFIII) benötigt (Übersicht bei de Jong und van der Vliet, 1999). NFI und NFIII binden dabei an die stromabwärts liegende Hilfsregion und erhöhen die Initiationsrate der DNA Replikation. NFII besitzt Topoisomeraseaktivität. Generell folgt die Replikationder Adenovirus DNA schliesslich folgendem Ablauf. Zunächst formen AdPol und pTP ein Heterodimer. Das DBP, welches in grossen Mengen produziert wird, bindet an die virale DNA und bedeckt das gesamte Adenovirusgenom. DBP erhöht dabei die Affinität des NFI an seine Erkennungssequenz (Cleat und Hay, 1989a, 1989b; Stuiver und van der Vliet, 1990). NFIII besitzt eine POU-DNA Bindedomäne (Sturm und Herr, 1988, Sturm et al., 1988), interagiert zusätzlich über eine POU Homeodomäne mit pTP und rekrutiert somit den Proteinprimer (pTP) an seine Bindestelle im *ori* (de Jong et al., 2002). Es bildet sich der Präinitiationskomplex durch direkte Interaktion von pTP-AdPol-NFIII mit NFI und DBP, welche bereits an ihren Erkennungssequenzen im *ori* liegen. Der Komplex wird vermutlich durch Interaktion des pTP-AdPol mit dem an das DNA-gebundene TP stabilisiert (Pronk et al., 1992; Pronk und van der Vliet, 1993), worauf die DNA-Helix geöffnet wird. Möglicherweise spielt die ATP-unabhängige Eigenschaft des DBP, DNA-Helixstrukturen zu destabilisieren (Pronk et al., 1994), dabei eine grosse Rolle. AdPol katalysiert anschliessend die Bindung eines Serin-OH Restes des pTP mit einem dCTP. Die Synthese der ersten wenigen Nukleotide nach der Replikationsinitiation mag unkonventionell sein, denn das pTP-CMP interagiert zunächst mit der Guaninbase an der Genomposition 4. Hier werden zwei weitere Nukleotide an das dCMP des pTP addiert, so dass ein pTP-Trinukleotidkomplex (pTP-CAT) an der Genomposition 4-6 entsteht. pTP-CAT und der Initiationskomplex springen dann 3 Basenpaar stromaufwärts an das erste 5'-GTA-3' der Positionen 1-3 im *ori* (King und van der Vliet, 1994). Mit Start der Elongation zerfällt letztlich der Präinitiationskomplex (King et al., 1997) und AdPol trennt sich vom pTP. Die Effektivität der Synthese des naszierenden Stranges durch AdPol wird durch das DBP stark erhöht. Zur zweiten Replikationsrunde bildet der Nicht-Matrize-Strang mit beiden endständig gelegenen ITR-Sequenzen eine Schlaufe mit Doppelhelix, an dessen „Pfannenstiel" (Abb. 3) ein neuer Präinitiationskomplex gebildet wird.

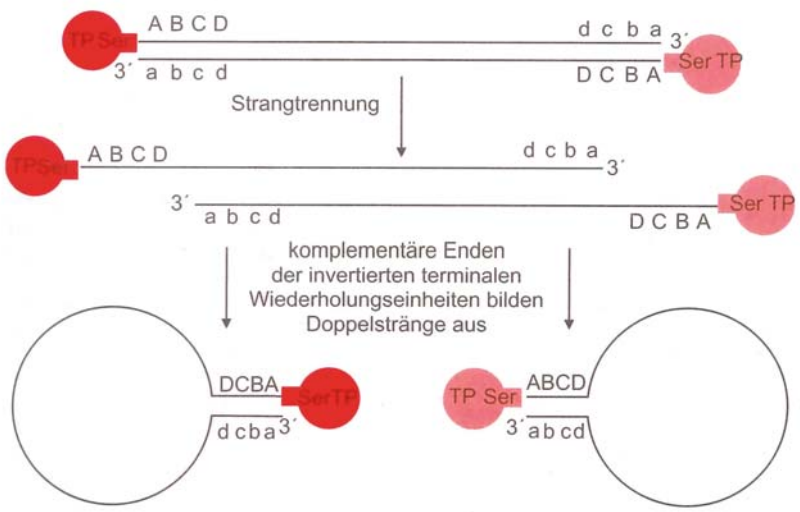


Abb. 3
Das Adenovirusgenom enthält an seinen Enden wiederholte Sequenzfolgen, die zueinander invertiert sein. Dies ist durch die grossen und kleinen Buchstaben schematisch angedeutet. Überführt man das doppelsträngige Genom in DNA-Einzelstränge, dann können ihre Enden doppelsträngige Bereiche ausbilden. Sie werden wegen ihres Aussehens als „Pfannenstiele bezeichnet. (Entnommen aus Modrow und Falke: „Molekulare Virologie" – Adenoviren, Spektrumverlag, 1997)

Nach wenigen DNA-Replikationsrunden wird der **M**ajor **L**ate **P**romoter (MLP) aktiv. Dieser Hauptpromotor kontrolliert die Expression aller sogenannten „späten Gene", welche primär für Strukturproteine codieren. Diese werden im Cytosol translatiert und allesamt wieder in den Zellkern zurückgeführt. Dort werden neue infektiöse Partikel bis zu einer Zahl von bis zu 10^5 Virionen pro Zellkern zusammengebaut. Letztlich platzt die Zelle und die Virionen werden freigesetzt.

5. Abortive Infektion von Adenovirus Typ 12 in BHK21 Zellen

Subcutan injiziertes Ad12 erzeugt in neugeborenen Hamstern Tumore (Huebner et al., 1962; Trentin et al., 1962; Yabe et al., 1962; Kuhlman et al., 1982). Dabei wurden Tumore bei unter die Haut injiziertem Ad12 nur an der Injektionsstelle gebildet. Manchmal liessen sich Tumorzellen auch in Lymphgefässen nachweisen (Kuhlman et al., 1982). Wurde das Virus in den ersten 24 h nach der Geburt intramusculär in den Gluteus Maximus von Hamstern injiziert, induzierte Ad12 ebenfalls undifferenzierte Tumore (Hilger-Eversheim und Doerfler 1997; Hohlweg et al, 2003). Interessant war, dass zur Tumorentwicklung mindestens $5x10^5$ Virionen injiziert werden mussten. Die grosse Mehrheit entstehender Tumore bei dieser muskulären Injektion, entstand aber nicht am Injektionsort, sondern in den Epithelien der Bauchhöhle und der Leber (Hohlweg et al., 2003). Doch woher kommt dieses stark onkogene Potential von Ad12? Menschliche Zellen sind für Ad12 permissiv. Somit werden menschliche

HeLa Zellen produktiv infiziert. Der zeitlich streng kontrollierte Infektionsablauf beginnt mit der Adsorption an die Zelle, das Virion wird endozytiert und in ins Cytosol entlassen. An der Kernpore angekommen wird die adenovirale DNA in den Kern eingeschleust. Die frühen Gene werden sofort exprimiert, anschliessend wird die virale DNA repliziert. Mit der Aktivierung des MLP-Promotors werden Strukturproteine synthetisiert, die im Zellkern zu neuen infektiösen Viren zusammengebaut und nach Lyse der Zelle freigelassen werden.

In mit Ad12 infizierten BHK21 Hamsterzellen ähneln die ersten Infektionsschritte sehr einer produktiven Infektion. Auch hier ist bekannt, dass zumindest einige wenige Ad12 Genome in den Zellkern von Hamsterzellen gelangen, und die meisten der frühen Gene zumindest auf niedrigem Niveau exprimiert werden. Eine Replikation der DNA konnte in diesem System jedoch nie beobachtet werden. Vielmehr konnte eine Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom gezeigt werden (Doerfler 1968; Doerfler 1970; Sutter et al., 1978; Stabel et al., 1980), was ein signifikanter Hinweis auf die Fähigkeit der Zelltransformation durch Ad12 sein könnte. Produkte später Gene oder gar reife infektiöse Virionen hat man bis heute nicht finden können. Die abortive Infektion von Ad12 in BHK21 Zellen lässt sich jedoch nicht auf andere Virussubtypen übertragen. Ad2 oder Ad5 zum Beispiel können BHK21 Zellen produktiv infizieren (Strohl et al., 1966; Rouse et al., 1966; Doerfler 1969). Auch die Tatsache, dass die produktive Infektion von Ad12 in HeLa Zellen weniger effizient ist als die Virusproduktion von Ad2 unter gleichen Bedingungen, lässt vermuten, dass Ad12 Defekte besitzt oder gar Funktionen fehlen, ohne die eine produktive Infektion in BHK21 Zellen unmöglich ist.

Die abortive Infektion von Ad12 in BHK21 Zellen ist nicht von einem Ereignis abhängig. Vielmehr liegt ein komplexes System vor, in dem nicht nur die DNA-Replikation verhindert wird, sondern vielschichtige Blocks in allen Phasen der Infektion auftreten.

Im Detail betrachtet schien der erste Block des abortiven Systems in der Expression früher viraler Gene zu liegen. Verglichen mit dem produktiven System, wurden E1A Gene nicht nur später exprimiert (Lucher 1990), auch die Menge produzierter Proteine betrug teilweise nur 10 % dessen, was in HeLa- oder KB-Zellen akkumuliert wurde (Lucher 1990, Hösel et al., 2001). Das E4-34kDa Protein konnte gar nicht detektiert werden (Esche et al., 1979).

Doppelinfektionen von BHK21 Zellen mit Ad2 und Ad12 führten im Infektionsverlauf zwar zu viraler DNA-Replikation beider Virustypen sowie auch zur Transkription später Ad12 viraler Gene, jedoch gab es keinerlei Hinweise auf neue Ad12 Partikel (Klimkait und Doerfler, 1985, 1987). Zum gleichen Ergebnis führte die Infektion von BHK297-C131 Zellen mit Ad12. In diesen Zellen sind 18,7% des linksterminalen Genoms von Ad5 stabil integriert.

Desweiteren exprimieren BHK297-C131 Zellen konstitutiv die E1 Region von Ad5. Das Ergebnis der Infektion von BHK297-C131 Zellen mit Ad12 war eine Komplementation durch die Ad5-E1 Proteine, die zu einer Ad12 DNA-Replikation sowie Transkription später viraler Gene führte. Jedoch blieb eine Produktion neuer Virionen aus (Klimkait und Doerfler, 1985; Schiedner et al., 1994). Komplementationsversuche mit Ad12 als Hilfsvirus zeigten erstaunliches. So ist ein Ad5 mit deletierten E1A- (*dl312*) oder E1B-(*dl313*) Regionen allein in Hamsterzellen nicht replikationsfähig. Coinfektion mit Ad12 bewirkt volle Replikation und Produktion Ad5 viraler Partikel. Ad12 ist in diesem Ad12/Ad5-Deletionsmutanten Komplementationssystem nur bedingt in der Lage, eigene DNA-Replikation zu starten. Ist Ad5-E1B deletiert (*dl313*), beobachtete man eine sehr schwache Ad12 DNA Replikation bei intakter Ad5-E1A Region. Im anderen Fall zeigte eine Ad5-E1A Deletion (*dl312*) gute Ad12 DNA Replikation, Ad5-E1B konnte Ad12-E1B Defekte somit ausgleichen (Klimkait und Doerfler, 1987).

So scheinen die Ad12 E1 Proteine transaktivierend auf die Ad5 Infektion zu wirken, was zur Ad5 DNA-Replikation, Aktivierung später Ad5 virale Gene und deren Translation führt. Ad5-E1B können Replikationsdefekte Ad12 viraler DNA besser beheben als Proteine der Ad5-E1A-Region.

Die abortive Infektion von Ad12 in BHK21 Hamster Zellen ist nicht nur auf einen Block der DNA-Replikation zurückzuführen. Auch sind bislang keinerlei Transkripte der virus-assoziierten (VA) RNA oder der späten Genregion gefunden worden. (Ortin et al., 1976; Klimkait und Doerfler, 1985, 1987; Jüttermann et al., 1989). Hauptursache des Fehlens später Transkripte in Ad12 infizierten BHK21 Zellen, scheint die Präsenz einer 33 Nukleotide langen Mitigator Sequenz zu sein, die +320 Basenpaare abwärts des MLP lokalisiert ist. Eine Deletion dieses negativ regulatorischen Elementes aktiviert den Ad12 MLP in Hamsterzellen, und erhöht *in vitro* sogar die Effizienz des MLPs in permissiven humanen Zellen (Zock und Doerfler, 1990). Da Ad2 und Ad5 keinen Mitigator besitzen, vermutet man, dass diese Sequenz einen essentiellen Beitrag zur abortiven Ad12 Infektion in Hamsterzellen liefert: der Mitigator blockiert die Transkription und Expression später Gene, es werden keine Strukturproteine synthetisiert und keine Produktion neuer Virionen wird ermöglicht. Letztlich lebt die Zelle weiter, was eine wichtige Voraussetzung zur malignen Transformation darstellt.

Wie bereits besprochen, kann der Transkriptionsblock des MLP in Ad12 infizierten BHK21 Zellen durch Coinfektion von Ad2 oder Ad5, oder durch konstitutive Expression der Ad5 E1 Region in BHK297-C131 Zellen überkommen werden. Späte Ad12 Transkripte konnten in diesen System zwar nachgewiesen, deren Translation aber niemals beobachtet

werden (Klimkait und Doerfler, 1985, 1987; Schiedner et al., 1994). Dabei scheint der Zustand der späten RNAs des MLP völlig in Ordnung zu sein. So sind die RNAs alle polyadenyliert und besitzen eine intakte dreiteilige „Leadersequenz“ (Logan und Shenk, 1984). Diese im 5’-Bereich liegende Sequenz entsteht durch intensives Spleißen eines Vorläufers. Dabei wird vermutet, dass die zweite und dritte Teilsequenz komplexe Sekundärstrukturen ausbilden, die anstelle der eukaryotischen 5’-*Cap* Struktur die Translation einleiten können, da in Adenovirus infizierten Zellen das 24 kDa grosse *Cap*-bindende Protein unterphosphoryliert und somit inaktiviert wird (Huang und Schneider, 1991).
Obwohl also alle nötigen viralen Faktoren für eine Translation vorzuliegen scheinen, besteht trotzdem ein Block in der Synthese später Proteine.

6. Das präterminale und das terminale Protein der Adenoviren.

An beiden 5’-Enden eines Adenovirus DNA Doppelstranges sitzt je ein kovalent gebundenes, 55 kDa grosses, terminales Protein (TP). Das 80 kDa grosse präterminale Protein (pTP) fungiert als die aktive Form bei der Initiation der viralen DNA Replikation. (Challberg et al., 1980; Enomoto et al., 1981). In der späten Phase der Infektion wird das pTP durch Proteolyse durch die virale Protease zum 55 kDa TP prozessiert. Untersuchungen des Ad2 pTP haben gezeigt, dass die Proteolyse zum TP über eine 61 kDa grosse Zwischenstufe, dem iTP (intermediäres terminales Protein) verläuft. Da die Proteinschnittstellen unter den TPs aller analysierten Adenovirustypen konserviert vorliegen, wird dem iTP eine tragende aber weitgehend noch unbekannte Rolle im Infektionszyklus zugesprochen (Webster et al., 1989; Webster et al., 1997). Das pTP übernimmt in der Replikation die Funktion des Proteinprimers für die DNA-Synthese und wird später zum TP prozessiert. Zunächst aber positioniert sich das pTP/AdPol Heterodimer (Lichy et al., 1982; Stillman et al., 1982) durch Protein-Protein und Protein-DNA Interaktionen am *ori*. Genetische und biochemische Untersuchungen liessen erkennen, dass die aminoterminale Region des pTP eine spezifische DNA Bindung, Interaktion mit AdPol und Initiation der DNA Replikation ermöglicht (Fredman et al., 1991; Freimuth und Ginsberg, 1986; Pettit et al., 1989; Roovers et al., 1993; Webster et al., 1994). Desweiteren besitzt pTP eine NLS (nukleare Lokalisierungssequenz), welche zentral im pTP oder in der aminoterminalen Region des TP liegt. Zhao und Padmanabhan konnten 1988 zeigen, dass mit Hilfe dieser NLS der nucleare Transport des pTP vollzogen und der des pTP/AdPol erhöht wurde. Im Nukleus selbst wurden TP-DNA, pTP, virale Coreproteine V,

VII, und 11 kDa sowie Capside eng mit der Kernmatrix assoziiert vorgefunden (Schaack et al., 1990; Fredman und Engler, 1993). Zudem wurde vorgeschlagen, dass die Assoziation der TP-DNA oder des pTP mit der Kernmatrix zur Bildung adenoviraler Replikationszentren in spezifischen subnuklearen Domänen führt (Fredman und Engler, 1993; Webster et al., 1997a). Obwohl die tatsächlichen Bindedomänen des pTP an die Kernmembran bisher nicht identifiziert wurden, konnte man doch anhand dreier pTP Linker-Insertionsmutanten feststellen, dass diese Mutanten zwar keine Auswirkungen auf die DNA-Replikation hatten, das mutierte pTP aber auch nicht an die Kernmatrix binden konnten (Fredman et al., 1991). Kernmatrix assoziiertes pTP interagiert noch mit einer Anzahl weiterer zellulärer Proteine (Angeletti und Engler, 1998), deren Funktion in der Adenovirusreplikation aber noch nicht bestimmt werden konnte.

Weitere Eigenschaften der TP-DNA sind dadurch definiert, dass in Transfektionsexperimenten TP-DNA um mehrere Grössenordnungen besser infiziert als proteinfreie DNA (Tamanoi und Stillman 1982; Van Bergen et al., 1983). TP-DNA ist zudem eine etwa 20-fach bessere Matrize in *in vitro* Replikationesversuchen (Pronk und van der Vliet, 1993) und bietet genauso wie sein pTP-DNA Pendant einen 5'-3' Exonukleaseschutz. Es soll ausserdem betont werden, dass *in vivo* zunächst TP-DNA die Matrize für die frühe Transkription und die erste Replikationsrunde ist, in weiteren Replikationsrunden aber pTP-DNA die Matrize stellt. Die proteolytische Spaltung von pTP zu TP findet erst in der späten Replikationsphase statt. Zuletzt sei noch angemerkt, dass nur pTP, nicht TP, an DNA und AdPol bindet (Webster et al., 1994).

7. Der humane CAR Rezeptor

Vor etwa 25 Jahren konnte gezeigt werden, dass Gruppe B Coxackie Viren (CBV) und Adenoviren (Ad) des Subtyps C den gleichen Rezeptor zur Adsorption an Wirtszellen zu teilen schienen (Lonberg-Holm et al., 1976). Dieser als CAR (= **C**oxackie and **A**denovirus **r**eceptor) bezeichnete primäre Rezeptor der Adenovirenadsorption ist aber nicht alleiniges Ziel einer effizienten Internalisierung. Zunächst bindet zwar das Knobprotein der Ad Fiber an CAR, es folgt aber eine Interaktion der Pentonbasis mit Zellintegrinen über ein RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp). Dabei scheinen die Integrine $\alpha_v\beta3$ und $\alpha_v\beta5$ bevorzugt zu binden (Wickham et al., 1993). Interaktionen weiterer Integrine sind nicht auszuschliessen (Wickham 2000).

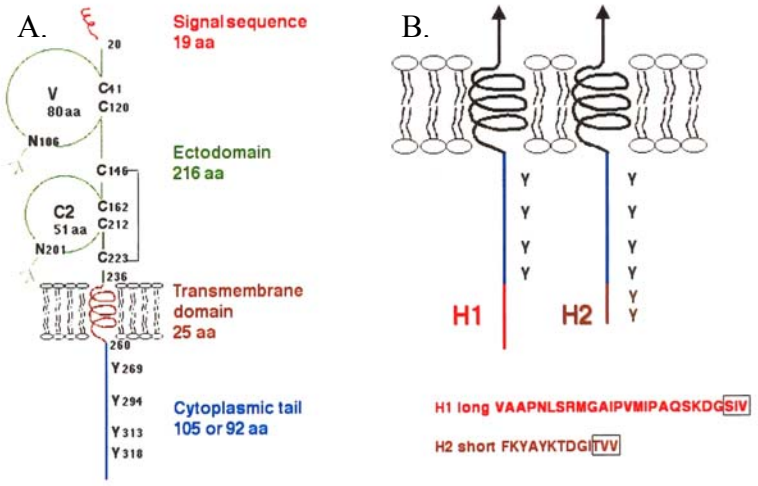


Abb. 4
Schematische Abbildung des menschlichen CAR Proteins (A) und seiner zwei Isostrukturen (B). Aufgrund der alternativen Splice-möglichkeiten besitzt der cytoplasmatische Teil am C-Terminus die unterschiedlichen Isostrukturen H1 und H2 (entnommen aus Philipson und Petterson, 2003; nach Tomko et al., 1997 und Bergelson et al., 1997).

Das humane Gen, welches für CAR codiert, liegt auf Chromosom 21 an der Position q11.2. Das CAR Protein ist ein Typ 1 integrales Trans-membranprotein (Abb. 4) mit Sequenzähnlichkeiten zu Mitgliedern der IgSF (immunoglobulin super-family) (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997). Der ORF (engl. Open reading frame = offener Leseraster) des humanen CAR enkodiert für 365 Aminosäuren, die zusammen eine kurze Leitsequenz, eine variable und eine konstante Ectodomäne, eine Transmembrandomäne und einen cytoplasmatischen Schwanz bilden (Abb. 4a). Durch alternatives Spleißen können zwei unterschiedlich lange cytoplas-matische Domänen, 105 oder 92 Aminosäure lang, generiert werden. Das nackte Protein hat eine molekulare Masse von 40 kDa, aufgrund zweier angeknüpfter Glykane an Asn106 und Asn201 beträgt die M_r des physiologischen Proteins aber 46 kDa. Aufgrund der 4 bzw. 6 Tyrosinaminosäuren im cytoplasmatischen Teil (je nach Länge der Spleißvariante (Abb. 4b), und der jeweils an beiden Enden der C-Termini vorhandenen PDZ-Bindemotive, könnte CAR in Signaltransduktionswege involviert sein. Es wurden jedoch bis heute keine Anhaltspunkte für solche Aktivitäten gefunden. Die Homologie des CAR zwischen Mensch, Maus, Ratte, Hund und Schwein liegt bei etwa 90 %, wobei die IG1 Region mit 91-94% Homologie konservierter ist als die IG2 Domäne (83-89%) (IG1 und 2 = Ectodomänen). Das Ad Knobprotein benutzt die IG1-Domäne zur Interaktion mit der Wirtszelle, jedoch nicht Gruppe B Adenoviren. Da die Subgruppen A und C-F der Adenoviren aber zum Teil sehr unterschiedliche Wirtszellen befallen, geht man davon aus, dass zwar CAR der primäre Binderezeptor ist, aber in vielen Fällen weitere spezifische Wirtszellinteraktionen nötig sind.

Die cytoplasmatische Domäne von CAR scheint keine Bedeutung für die effiziente Internalisierung von Adenoviren in die Zellen zu haben. Wird diese Domäne gegen einen GPI-Anker ersetzt, oder auch einfach gekürzt, hat das keinen Einfluss auf die Penetration

(Wang und Bergelson, 1999). Das deutet darauf hin, dass sekundäre Rezeptoren, wie evtl. die α_v-Integrine für die Infektion notwendig sind.

Mittlerweile häufen sich die Hinweise, dass CAR gravierend an Zell-Zell Interaktionen beteiligt ist und entweder mit anderen Mitgliedern der IgSF oder gar mit sich selbst interagiert (Chrétien et al., 1998). Ein spezifischer Ligand für CAR konnte noch nicht identifiziert werden. Da CAR Moleküle jedoch dimerisieren können wird vermutet, dass CAR mit sich selbst homophil interagieren könnte. So aggregieren Maus-CAR (mCAR) transfizierte C6 Gliomazellen der Ratte nur, wenn der Rezeptor exprimiert wird (Honda et al., 2000), und auch nur dann, wenn alle aggregierenden Zellen mCAR positiv sind. Gleiches gilt für transfizierte CHO Zellen mit dem humanen CAR Gen (Cohen et al., 2001a; Cohen et al., 2001b).

Nativer CAR, genauso wie CAR mit GPI-Anker, liegen oft in Regionen von Zell-Zell Interaktionen gehäuft vor, und zwar räumlich abgegrenzt in sogenannten „tight junctions" polarisierter Zellen. Zerstört man diese tight junctions z.B. mit EDTA, können Adenoviren die Zelle infizieren (Cohen et al., 2001a). Die Idee der homophilen Interaktion wird noch dadurch bestärkt, dass CAR in Kristallen, genauso wie in Lösung, immer Homodimere bildet. Wie andere Zellkontaktproteine auch, könnte CAR in der Signalübertragung und Regulation der Zellproliferation oder Zelldifferenzierung beteiligt sein. Bewiesen ist diese Möglichkeit nicht.

Prinzipiell könnte es möglich sein, für die Adenovirus Infektion nichtpermissive Zellen permissiv zu machen. Die Ineffizienz von Ad z.B. Lungenzellen zu infizieren, wurde erkennbar beim Versuch, Epithelien der Luftwege mit der cDNA des Cystischen Fibrose Transmembranregulators (CFTR) zu transduzieren. Verwendet wurde Ad als Vektor (Grubb et al., 1994; Pickles et al., 1998; Walters et al., 1999). Die Basis hierzu offenbarte sich, als man zeigen konnte, dass ausdifferenzierte Luftweg-Epithelzellen nicht mit Adenovektoren über den apikale Zellweg infiziert werden konnten. Ursache war ein Fehlen des CAR sowie von α_v-Integrienen auf der Zelloberfläche, sowie die Präsenz einer Glycokalyxschicht, welche sich als effiziente physikalische Barriere erwies (Pickles et al 2000). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass CAR nur an basolateralen Oberflächen polarisierter Zellen exprimiert wurde, unabhänging davon, ob es sich um *in vivo* oder transfizierte Zellkulturen handelte (z.B. MDCK Zellen, Walters et al., 1999; Pickles et al., 2000). Erst die enzymatische Zerstörung der Glycokalyx, kombiniert mit einer apikalen Expression des CAR machte eine Ad Infektion von der apikalen Seite möglich (Pickles et al., 2000). Apikale CAR Expression

wurde durch Entfernen des cytoplasmatischen Schwanzes oder durch Substitution mit einem GPI-Anker erreicht (Pickles et al., 2000; Walters et al., 2001)

Bei Adenovirus Gruppe C Infektionsstudien in zahlreichen Zellinien stellte sich heraus, dass eine Infektion nur bei exprimiertem CAR Rezeptors möglich war. Eine Expression von $\alpha_v\beta$ 3/5 Integrinen war nicht von Bedeutung (Hemmi et al., 1998; Mori et al., 1999; Fechner et al., 2000; Asaoka et al., 2000; You et al., 2001; Fuxe et al., 2003). Ebenso machte eine CAR Transfektion in CAR negative Zellen, z.B. NIH 3T3 Zellen, diese für eine Adenovirusinfektion zugänglich (Tomko et al., 1997; Li et al., 1999). Wie dem auch sei, so sind einige Gewebe trotz CAR Präsenz aufgrund physikalischer Barrieren für Adenoviren nicht zu infizieren. Zerstörung dieser Barrieren durch Ethanol oder Polyamiden kann aber die Zugänglichkeit für Adenoviren oder –vektoren in Wirtszellen erhöhen (Engler et al., 1999; Connor et al., 2001).

Breit angelegte Untersuchungen zur Expression des CAR Rezeptors in diversen Zelltumorlinien ergaben eine breit gefächerte Varianz von „sehr hoch exprimiert“ bis „nicht detektierbar“. Interessanterweise korrelierte aber die Menge an exprimiertem CAR mit der Infektionsfähigkeit durch Adenoviren – je mehr CAR zugänglich exprimiert wurde, desto wahrscheinlicher war die Infektion durch Adenoviren (Freimuth 1996; Fechner et al., 2000; Cripe et al., 2001; Okegawa et al., 2000; Li et al., 2000; You et al., 2001). Transfektion der CAR cDNA in CAR-negative Zellen, machte diese für Adenoviren zugänglich (Tomko et al., 1997; Li et al., 1999). Analysen primärer Tumore wiesen eine ebensogrosse Variabilität in der CAR Expression wie die Zellinien auf. Es sind noch weitere Studien angebracht, um einen genauen Zusammenhang zwischen CAR Expression, Adenovirusinfektion und Tumorbildung erklären zu können. Die Präsenz des CAR Rezeptors mag zwar die Empfänglichkeit entsprechender Adenoviren erhöhen, CAR muss aber ohne physikalische Barrieren zugänglich sein, und ob letztendlich eine produktive Infektion erfolgt, oder ob sich Tumoren bilden, bleibt ungewiss.

8. Zielsetzung der Arbeit

Adenovirus Typ 12 (Ad12) infiziert menschliche HeLa Zellen produktiv. Injizierte man jedoch mindestens $5x10^5$ Pfu Ad12 in den syrischen Goldhamster während der ersten 24 h nach der Geburt, entwickelten sich Tumore wenige Wochen nach der Injektion. Ad12 DNA integrierte sich stabil in das Wirtsgenom und transformierte die Zelle.
Die Ad12 Infektion verläuft in Hamsterzellen abortiv. Ad12 DNA gelangt bis in den Zellkern der Hamsterzellen, dort werden einige frühe Gene exprimiert, jedoch wird die virale DNA nicht repliziert. Dieser Block in der Ad12 Infektion von Hamsterzellen ist seit über 30 Jahren bekannt (Doerfler und Lundholm, 1970). Diverse Anläufe, den DNA Replikationsblock durch Komplementation von Ad2 oder Ad5 viralen Funktionen - Ad2 und Ad5 infizieren Hamsterzellen produktiv - zu überkommen, hatten Erfolg (Klimkait und Doerfler, 1985, 1987), jedoch blieb die Ursache des DNA Replikationsblocks in Ad12 infizierten BHK21 Hamsterzellen letztlich ungeklärt.

In dieser Studie wurde versucht, den Replikationsblock der Ad12 DNA in BHK21 Hamsterzellen genauer zu untersuchen. Wir konzentrierten uns zunächst auf den viralen Proteinprimer, das pTP. Wir vermuteten, dass frühe Ad12 Gene in Hamsterzellen nicht ausreichend exprimiert, und somit keine oder zu wenige Proteinprimer synthetisiert wurden, die eine Ad12 DNA Replikationsinitiation ermöglichen konnten. Eine Überexpression früher viraler Gene in Ad12 infizierten BHK21 Zellen sollte helfen, den viralen DNA Replikationsblock zu überkommen. Zusätzlich sollten die Transkriptionsmuster in der frühen Ad12 Infektionsphase in BHK21 Zellen mit denen humaner HeLa Zellen verglichen werden. Die Ergebnisse sollten Aufschluss über die Ursachen für die abortive Infektion von Ad12 in Hamsterzellen geben, denn der Ad12 DNA Replikationsblock könnte als eine der Voraussetzungen für die Ad12 Tumogenese angesehen werden.
Untersuchungen zur frühen Phase der Infektion sind noch aus anderer Perspektive interessant. Das Modell, Adenoviren als Verktoren zur Transduktion von Zellen zu nutzen, ist zur Zeit von grossem Interesse. Daher ist es erforderlich jene Mechanismen zu studieren, mit welchen Adenoviren in ihre Wirtszellen eindringen, um ihre Genome in den Zellkernen zu exprimieren. Untersuchungen zum Kernimport adenoviraler DNA in die Wirtszelle könnten die benötigte Richtung weisen und Erkenntnisse vielleicht neue Transfermethoden aufzeigen.

B. Material

1. Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
2-Propanol	Merck, Darmstadt
5-Bromo-2'-deoxyurinin	Sigma, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese-Gel 30 und 40	Roth, Karlsruhe
Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	FMC, Rockland, ME, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma, Steinheim
Ampicillin	Gruenenthal, Stolberg
Bactoagar	Fluka, Buchs, Schweiz
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, MI, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Merck, Darmstadt

Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie R250	Serva, Heidelberg
DABCO (1,4-Diazobicyclo[2.2.2]octan)	Sigma, Steinheim
Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate	Promega, Madison, WI, USA
Dextransulfat	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Diethylether	Merck, Darmstadt
DIG Easy Hyb	Roche, Mannheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM Zellmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS, ultrarein)	Merck, Darmstadt
EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Ethylene **g**lycol-bis(**s**uccinic acid N-hydroxysuccinimide ester) = EGS	Sigma, Steinheim
Formaldehyd (37 %)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Cytogen, Berlin
Glukose (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Glycerin, 87 %	Merck, Darmstadt

Heringsspermien-DNA Typ XIV	Sigma, Steinheim
Humane cot1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Hydroxychinolin	Sigma, Steinheim
IGEPAL CA-630	Sigma, Steinheim
IPTG (Isopropyl-β-thiogalactopyranosid)	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalium-*di*-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
Milchpulver (Biomagermilchpulver)	Heirler, Radolfzell
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-*di*-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Roth, Karlsruhe
Neutrale Rot Lösung (N2889)	Sigma, Steinheim
Oligo-$(dT)^{12-18}$ Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz

Pefabloc	Roche, Mannheim
Penicillin	Hoechst, Frankfurt
Phenol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Poly-dA	Roche, Mannheim
Protein-A-Agarose	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
RNAse out (RNAse inhibitor)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI Medium 1640 - ohne L-Glutamin - ohne rotes Phenol	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (rauchend)	Merck, Darmstadt
Sea Plaque Agarose	Biozym, Hess. Oldenburg
Select-yeast-extract	Life Technologies, Paisley, Schottland
Sephadex G-50	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Stickstoff, verflüssigt	Linde, Höllriegelskreuth
Streptomycin	Hoechst, Frankfurt
Sucrose für Gradienten	Merck, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Steinheim

Tween 20	Sigma, Steinheim
Xylencyanol	Fluka, Buchs, Schweiz

2. Sonstiges Labormaterial

6 cm ∅ Gewebekulturschalen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
6-well Platten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Abbildplatten	Fuji, Düsseldorf
Access RT-PCR Kit	Promega, Madison, WI, USA
Aquariumfilterwatte	Weltweitprodukt, Holm bei Hamburg
Bakterienbrutschrank	Memmert, Schwabach
Bakterieninkubator	Memmert, Schwabach
Blaukappröhrchen, 15 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Blaukappröhrchen, 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Concert Midi-Kit	Life-Technologies
Deckgläser	AL, Mainz
Dialyseschläuche	Medicell, London, Großbritannien
DNA-Gelextraktionskit Quick	Qiagen, Hilden
DNA-Sequenziermaschine	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ECL-Detektionskit	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien

Einwegkanülen	Terumo, Leuven, Belgien
Einwegküvetten	
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa-Gavaert, Mortsel, Belgien
Frischhaltefolie	Melitta, München
Gel Blotting Papier GB003	Schleicher und Schuell, Dassel
Geltrocknungsanlage Modell 224	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Geneamp PCR System 2400	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Genepulser	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gewebekulturflaschen (Falcon 3014, 3023, 3028)	Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA
Glaswaren	Schott, Mainz; Brand, Wertheim
Hybridisierungsinkubator	Bachofer, Reutlingen
Hybridisierungsröhren	Bachofer, Reutlingen
Inkubator Cytoperm Typ 8080	Heraeus, Düsseldorf
LightCycler Kits	
- Quantitect Sybr Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
- LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I	Roche, Mannheim
Magnetrührer	Janke und Kunkel, Staufen
Membranpumpe	Vakuubrand, Wertheim

Mikroskope:	
• Phasenkontrastmikroskope:	
Diavert	Leitz, Wetzlar
Zeiss	Carl Zeiss, Jena
• Fluoreszenzmikroskop:	
LSM4	Carl Zeiss, Jena
Minigelkammer DNA-Pocketblock	Biozym, Hess. Oldenburg
Nagellack	Astor, Mainz
Netzgerät GPS 200/400	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Nitrozellulosemembran Hybond-P	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien
Nylonmembran (positiv geladen)	Roche, Mannheim
Objektträger Super Frost	Menzel-Gläser, Mainz
Parafilm „M“	American Can Comp., Greenwich, CT, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Diagnostik GmbH, Hess, Oldenburg
Peristaltikpumpe	Stalproduktor, Uppsala, Schweden
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten	
0 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
1 – 20 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
10 – 200 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettierpumpe Fortuna Labopet 240	Greiner, Frickenhausen
Pulsecontroller	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Quarzglasküvette 50 µl	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Radiomembrandetektor BAS 1000	Fuji, Düsseldorf
Reagenzglasrotator 3025	GFL, Burgwedel
Reaktionsgefäße	
1,7 ml	Brand, Wertheim
1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Rocky (Schwenkplatte)	Biometra, Göttingen
Röntgenfilme X-OMAT AR5	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Röntgenfilmkassetten (Dr. Goos) zur Autoradiographie mit zwei Verstärkerfolien (Suprema)	Dr. Goos, Heidelberg
Schüttelinkubator G25	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Sonifikator, Modell B-12	Branson Sonic Power, Danbury, CT, USA
Spectrophotometer DU 640	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Spritzen-Vorsatzfilter (22 und 45 µm)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Sterilbank	
Bio Gard Hood	Baker Company, Sansford, CT, USA
Antair BSK 4	Anthos Mikrosysteme, Köln

Stickstofftank	L'air Liquide, Champigny-Sur-Marne, Frankreich
SuperScript III First-Strand cDNA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Swing-out Rotor SW60	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Szintillationszähler LS 1801	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Tiefkühltruhe Revco ULT 1490 ST	Kühn+Bayer, Nidderau
Ultrazentifugenröhrchen , Polyallomer für SW41 Rotor	Konrad Beranek, Weinheim
Ultrazentrifugenröhrchen, Ultra.clear (SW 60)	Beckman, Palo Alto, CA, USA
UV-Lichtgenerator	Cybertech San Gabriel, CA, USA
Video-Dokumentationssystem, Cybertech CS1	Cybertech, San Gabriel, CA, USA
Vortex Genie 2	Bender&Holbein, Zürich, Schweiz
Wärmeblock, Driblock 08-3	Techne, Duxford, Cambridge, England
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserfilteranlage Super Q	Millipore, Bedford, MA, USA
Weißkappröhrchen, 15 ml	Dr. Kleef, Bonn
Zellkulturinkubator Steri-Cult 200	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
Zentrifugenbecher, PPCO 250 ml	Nalgene, Rochester, NY, USA

3. Zentrifugen

- Laborzentrifugen

Doctor	Wifuge, Stockholm, Schweden
Biofuge pico Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Cryofuge 5000	Heraeus Sepatech, Hanau
J2-21	Beckman, Palo Alto, CA, USA
MC 12 V Tischzentrifuge	Sorvall Instruments, Du Pont, Bad Homburg
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Hanau
Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Hanau
RC 5B	Sorvall Instruments, Du Pont, Bad Homburg
TC 6 Tischzentrifuge	Sorvall Instruments, Du Pont, Bad Homburg

- Ultrazentrifuge

L7-55	Beckman, Palo Alto, CA, USA

4. Enzyme

- Restriktionsendonukleasen

Die nachfolgend aufgeführten Enzyme wurden mit den empfohlenen 10 x Puffern verwendet.

Eco RI	Roche, Mannheim
BamHI	Roche, Mannheim
NheI	Roche, Mannheim
PstI	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen
SmaI	Roche, Mannheim

- sonstige Enzyme

Alkalische Kälberdarm-Phosphatase	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	Roche, Mannheim
Lysozym	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNAse A	Sigma, Steinheim
SuperScrip III RNase H- Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II RNaseH$^-$ reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Taq DNA-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
Trypsin 1-300 (aus Schweinepankreas)	United States Biochemical, Cleveland, OH, USA

5. Größenmarker

DNA

Generuler 100 bp Leiter	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
λ-DNA / *Eco130I (StyI) / Mlu I*	MBI Fermentas, Wilna, Litauen
Low DNA marker	Invitrogen, Karlsruhe
pUC-Mix	MBI Fermentas, Wilna, Litauen

Protein

- prestained protein molecular weight standards, high range	Invitrogen, Karlsruhe

6. Radioisotope

Desoxycytosin-5'-[α^{32}P]-triphosphat spezifische Aktivität >3000 Ci/mmol	NEN, DuPont, Boston, MA, USA
[^{3}H]-Desoxythymidin spezifische Aktivität 370 GBq/mmol	NEN, DuPont, Boston, MA, USA

7. Zellinien

HeLa (menschliche Zellen eines Cervix-Karzinoms)	**A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection (ATCC) Rockville, USA; Nummer ATCC CCL 2
BHK21 Nierenzellen neugeborener Hamster	**A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection (ATCC) Rockville, USA; Nummer ATCC CCL 10 Stoker und McPherson, 1964
C131 Ad5 transformierte Zellinie	Visser et al., 1980
T637 Ad12 transfomierte Zellinie	Strohl et al., 1970
A549 (Menschliche Zellen eines Lungenkarzinoms)	**A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection (ATCC) Rockville, USA; Nummer ATCC CCL 185

8. Bakterienstämme

E.coli Bl 21	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
E.coli XL1-blue	Stratagene, La Jolla, CA, USA
E.coli XL1-blue, transformationskompetent	Stratagene, La Jolla, CA, USA

9. Plasmide

pGEX-3X Expressionsvektor	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
pEGFP	Clontech, Palo Alto, CA, USA
pBR322 – Ad12 EcoRI-B	Geschenk von Dr. Marianna Hösel
M13mp18	Amersham, Freiburg

10. Primer

Alle verwendeten Primer sind bei der Firma Sigma-genosis, Steinheim bestellt worden.

Primer zur Sequenzierung

M13 reverse sequencing primer 17-mer	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
M13 sequencing primer 17-mer	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Primer zur hCAR Vektorklonierung:

NheI-hCAR:	5'-gaa gct agc atg gcg ctc ctg ctg tgc-3'
BamHI-hCAR:	5'-aaa gga tcc cta tac tat aga ccc atc-3'
HindIII-hCAR:	5'-aac aag ctt cga tgg cgc tcc tgc tg-3'

Primer zur quanitativen PCR zur Detektion importierter viraler DNA

Ad2 E1A FW	5'-gag aca tat tat cag cca cgg-3'
Ad2 E1A RW	5'-cca cag gtc ctc ata tag caa agc-3'
Ad12 E1A FW	5'-cct tgg tcc tgt cgt atc agg aag ctg acg-3'
Ad12 E1A RW	5'-tgt tgt agg ctc gca gat agc-3'

Primer zur Quantifizierung der RNA Transkriptionslevel

Ad 12 pTP RW	5'-ccg act cat aag ctg tg-3'
Ad12 pTP FW	5'-agc ctt agg tga cat caa c-3'
Ad12 Penton RW	5'-aag tgc gac tag aaa gc-3'
Ad12 Penton FW	5'-agc cgt cta ctc aca g-3'
Ad12 Fiber RW	5'-gga acc agg gca gta g-3'
Ad12 Fiber FW	5'-ata cga ccc tct gac ac-3'
Ad12 E1A RW – 1	5'-aga aac atg cgc cat t-3'
Ad12 E1A FW – 1	5'-agc att tgg tgg aca ac-3'
β-Aktin FW	5'-atg gat gat gat atc gcc gc-3'
β-Aktin RW	5'-gtg tgg tgc cag att ttc tcc-3'
human CAR RW 2	5'-atc aac gta aca tct cgc-3'
human CAR FW 2	5'-aaa gcc aaa ggg gaa ac-3'

Primer zur Klonierung einzelsträngiger Ad12 Gensequenzen

Protein	Enzyme zur Klonierung	Primersequenzen
E1A	EcoRI/HindIII	FW: 5′-gaa**gaattc**atgagaactgaaatgactc-3′ RW: 5′-tagaagctttgtgtccgggcaactctg-3′
E1B Transkription-seinheit	EcoRI/HindIII	FW: 5′-agc**gaattc**aggagctgagaagtgacc-3′ RW: 5′-tagaagcttggcaagcataac-3′
L1-52	EcoRI/HindIII	FW: 5′-ata**gaattc**tgtgcgcacactaatagc-3′ RW: 5′-gcaaagctttaggcataagctctttgtc-3′
Hex-Associated protein	EcoRI/HindIII	FW: 5′-aaa**gaattc**atggattaccttcaccgc-3′ RW: 5′-aagcttcgtcgctgccaacgttgcc-3′

Penton	EcoRI/PstI	FW: 5′-caa**gaattc**ccaaaggacgcagttac-3′ RW: 5′-gaactgcaggatggtgactcgctgaac-3′
Major core	EcoRI/HindIII	FW: 5′-aga**gaattc**cgcgtacgcggacattac-3′ RW: 5′-agaaagcttcatttcctcgtcgcggagc-3′
Minor core	EcoRI/HindIII	FW: 5′-cca**gaattc**aagccatggatgaattgc-3′ RW: 5′-aagaagcttggcgctgaaaagttgtcc-3′
11 kD core	EcoRI/HindIII	FW: 5′-gaa**gaattc**atggctcttacttgccg-3′ RW: 5′-tccaagcttttaatttttcgagaagc-3′
Protein VI	EcoRI/HindIII	FW: 5′-gaa**gaattc**ggcaccaaggcgtggaac-3′ RW: 5′-atcaagcttatgcaactggaacagatgc-3′
Hexon	EcoRI/PstI	FW: 5′-gcc**gaattc**acaatgtggcccaatgc-3′ RW: 5′-caa**ctgcag**taaagaagggtaggctc-3′
Endoprotease L3	EcoRI/HindIII	FW: 5′-gac**gaattc**tgctattgttaacactgc-3′ RW: 5′-cct**aagctt**tatttgagtccattttgc-3′
100kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-cct**gaattc**agtcaagtcattggtacc-3′ RW: 5′-cat**aagctt**ttcttccaagtcctcgac-3′
33 kD Phosphoprotease	EcoRI/HindIII	FW: 5′-atc**gaattc**atgatggagtggcgattc-3′ RW: 5′-cat**aagctt**gtgcgttgcaactgatc-3′
Protein VIII	EcoRI/HindIII	FW: 5′-gac**gaattc**aatgaattggttaagcgc-3′ RW: 5′-cct**aagctt**ccacaaattggagagttc-3′
E3-10.4 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-cat**gaattc**tggtgacggttcttctc-3′ RW: 5′-cat**aagctt**tctcacgtagtagtaatc-3′
E3-12.1 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-cca**gaattc**ttacctactttgagcttc-3′ RW: 5′-cca**aagctt**ctacagatgattaaattc-3′
E3-14.5 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-gca**gaattc**tttctttatgttaatccc-3′ RW: 5′-cat**aagctt**ggaagatcatcagtatac-3′
E3-14.7 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-acc**gaattc**gttaattgatttacaaac-3′ RW: 5′-acc**aagctt**ttaattcattggtaaaag-3′
Fiber	EcoRI/PstI	FW: 5′-caa**gaattc**atatagacaaggccaatc-3′ RW: 5′-caa**aagctt**attcttgggtaatgtaag-3′
IV2a	EcoRI/HindIII	FW: 5′-acc**aagctt**atacttgtttttctgac-3′ RW: 5′-gca**gaattc**tccacaatatgaatcc-3′
DNA-polymerase	PstI/HindIII	FW: 5′-aat**ctgcag**atgaagaccaaggacccg-3′ RW: 5′-acc**aagctt**aagggcgtacagttttgg-3′
Präterminales Protein	EcoRI/HindIII	FW: 5′-gcc**gaattc**ctcgtggaactcaacttg-3′ RW: 5′-aat**aagctt**aatcggcggcgcggacgag-3′
DNA Bindeprotein	EcoRI/HindIII	FW: 5′-tac**aagctt**aactaggggctggcttgc-3′ RW: 5′-tac**gaattc**atggccagcaatcagcac-3′
E4-11 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-cat**aagctt**ccagatcaaattgtaagc-3′ RW: 5′-cat**gaattc**gtttaaacctgcaaaatc-3′
E4-13 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-acc**aagctt**aacaaaaccacgtacgac-3′ RW: 5′-cat**gaattc**agcatggcttggtttagc-3′
E4-13.9 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-cat**aagctt**tggctgctttgcgcgaac-3′ RW: 5′-cat**gaattc**atgtgtattttacgggac-3′
E4-15 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-acc**aagctt**agttgtataaaatcatac-3′ RW: 5′-cat**gaattc**cggaactatttgcatggc-3′
E4-34 kD	EcoRI/HindIII	FW: 5′-acc**aagctt**ctctcgttgattataatc-3′ RW: 5′-gca**gaattc**gttgttaaccatttaatgc-3′
β-Aktin	EcoRI/HindIII	FW: 5′-ccg**gaattc**ttgactcaggatttaaaaac-3′ RW: 5′-ccg**aagctt**cataatttacacagaagc-3′

11. Antikörper

Anti BrdU	Sigma, Steinheim
Anti rabbit Alexa 488	Molecular Probes
Anti rabbit HRP	Amersham
Anti mouse HRP	Amersham
Kaninchen anti Ad12-Fiber	Schenkung von Dr. P. Freimuth, Brookhaven, NY, USA
Kaninchen anti Ad12 Protein IX	Schenkung von Dr. W. Seidel, Greifswald
Kaninchen anti Ad12 pTP	Diplomarbeit Dennis Webb, 2001

12. Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit Wasser aus einer Wasserfilteranlage „Super Q“ hergestellt

1 x SSC	150 mM NaCl 15 mM Na-Citrat
1 x TBE	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 77 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
1 x TBS	0,01 M Tris-HCl pH 8,0 0,15 M NaCl
10 x Laemmli Puffer (pro Liter)	144,19 g Glycin 30,29 g Tris 10 g SDS mit HCl pH von 8,3 eingestellt
10 % SDS	10 % SDS in ddH_2O(w/v)

10 x Western Blotpuffer	144,19 g Glycin 30,29 g Tris mit HCl pH von 8,3 eingestellt bei der Verdünnung auf 1 x Puffer werden 10 % Methanol zugegeben
2 M Mg^{2+}-Lösung (Elektroporation)	20,33 g $MgCl_2$ x 6 H_2O 24,65 g $MgSO_4$ x 7 H_2O mit H_2O auf 100 ml auffüllen und autoklavieren
2 x YT – Medium	0,5 % NaCl 1 % Select Yeast Extract 1,6 % Bacto-Tryptone
4 x Proteinladepuffer (ergibt 50 ml)	13 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 22,8 ml Glycerin (87 %) 4 g SDS 150 mM β-Mercaptoethanol 0,25 % Bromphenolblau Mit ddH_2O auffüllen
5 x MOPS-Puffer	0,2 M MOPS pH 7,0 50 mM Natriumacetat 5 mM EDTA pH 8,0
Cäsiumchlorid-Lösung	0,5 g CsCl/ml
Chloroform-Isoamylalkoholgemisch	Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24 : 1

Coomassie Färbelösung (pro Liter)	2 g Coomassie R 250 45 % Methanol 9 % Eisessig 46 % ddH_2O
Coomassie Waschlösung	10 % Eisessig 30 % Ethanol 60 % ddH_2O
DABCO	0,233 mg 1,4-**Dia**zo**b**icyc**l**o[2.2.2]**o**ctan 20 mM Tris-HCl pH 8,0 90 % Glycerin Lagerung im Dunkeln bei +4 °C
Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate	10 mM in H_2O
DNA-Stopmix (für Restriktionsendonukleasen)	50 % Glycerin 1 % SDS 0,1 M EDTA pH 7,8 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol
Dulbecco Medium	Bablanian et al., 1965 Lagerung bei +4 °C
Ethidiumbromid-Lösung	2 µg/ml in H_2O
Glukoselösung (Elektroporation)	36.04 g Glukose in 100 ml H_2O sterilfiltriert, Lagerung bei +4 °C
Heringspermien DNA	10 mg/ml in ddH_2O, Lagerung bei +4 °C

Churchpuffer	0,5 M NaH_2PO_4 pH 7,0 0,1 M EDTA 7 % SDS
Immunfluoreszenzblockpuffer	2 % BSA 0,05 % Tween 20 in PBS gelöst
ImmunoFISH-Hybridisierungspuffer	50% Formamid 10% Dextransulfat 2xSSC 50 mM $NaPO_4$ (pH 7)
IPTG	100 mM in H_2O sterilfiltriert, Lagerung bei +4 °C
Medium für Zellkultur	10 % FCS in Dulbecco Medium
LB-Agar (pro Liter)	20 g Bacto-Agar in LB-Medium
LB-Medium (pro Liter)	10 g Bacto-Tryptone 5 g Select-Yeast-Extract 5 g NaCl
Natriumacetatlösung	für DNA: 3 M NaAc pH 5,0 für RNA: 2 M NaAc pH 4,3
Southernwaschlösung 1	2 x SSC
Southernwaschlösung 2	2 x SSC 0,1 % SDS
Southernwaschlösung 3	0,1 x SSC 0,1 % SDS

Paraformaldehydlösung	1 g in 50 ml PBS-d
PBS	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na_2HPO_4 1 mM KH_2PO_4 1 mM $MgCl_2$ 1 mM $CaCl_2$ pH auf 7,4 einstellen
PBS-**d** (deficient)	PBS ohne $CaCl_2$ und $MgCl_2$
Phenol (zur DNA-Reinigung)	0,1 % 8-Hydroxyquinolin gesattigt mit 0,1 M Tris-HCl **pH 7,5**
Phenol (zur RNA-Reinigung)	0,1 % 8-Hydroxyquinolin gesattigt mit 0,1 M Tris-HCl **pH 4,3**
Plaque Medium	0.6 % Sea Plaque GTG Agarose gelöst in DMEM Zellmedium 5 % FCS
Proteinase K Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,5 5 mM EDTA 0,2 % SDS 200 mM NaCl
Proteinase K Stammlösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 8,5 bei – 20 °C gelagert

RNA Ladepuffer	50 % Glycerin 1 mM EDTA 0,4 % Bromphenolblau (w/v)
RNA Probenpuffer	10 ml deionisiertes Formamid 3,5 ml Formaldehyd (37 %) 2 ml 5 x MOPS-Puffer
RNAse A Stammlösung	10 mg/ml in H_2O nach Lösung 15 min gekocht (DNAse-Inaktivierung) und bei RT abkühlen lassen; Lagerung bei –20 °C
SOB – Medium (pro Liter)	20 g Bacto-Tryptone 5 g Select-Yeast Extract 0,5 g NaCl
SOC-Medium	SOB mit 20 mM Glukose 20 mM Mg^{2+}-Lösung vor Gebrauch frisch angesetzt
Southern-Gelinkubationslösung I	0,25 M HCl
Southern-Gelinkubationslösung II	0,4 M NaOH
STET-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 50 mM EDTA 8 % Saccharose 0,5 % Triton X-100
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA

Tris-Saline	14 mM NaCl 5 mM KCl 0,3 mM Na_2HPO_4 25 mM Tris-HCl pH 7,4 0,1 % Glukose (w/v) 0,03 % Penicillin (w/v) 0,02 % Streptomycin (w/v)
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-d 1,35 mM EDTA 0,03 % Penicillin (w/v) 0,02 % Streptomycin (w/v)
Western Blockpuffer (pro 250 ml)	5 % Magermilchpulver 1 x TBS 0,1 % Tween 20
Western Waschpuffer	1x TBS 0,1 % Tween 20
Weichagar (50 ml)	0,5 g bactotryptone 0,4 g NaCl 0,4 g Bactoagar

C. Methoden

1. Zellkultur

1.1 Passage von Zellen

1.1.1 Passage von Zellkulturen in Gewebekulturflaschen

Alle Passageschritte wurden aufgrund von Kontaminationsgefahr der Zellkulturen durch Fremdorganismen an einer Sterilwerkbank durchgeführt.
Die verwendeten Zellinien HeLa und BHK21 waren adhärent wachsende Zellen, welche bei 37 °C kultiviert und in Zellkulturflaschen (Falcon 3014, 3023, 3028) mit einer Grundfläche von 75 cm^2 oder 175 cm^2 gehalten wurden. Sobald eine Zellkultur vollkonfluent gewachsen war, wurde sie in einer zellspezifischen Verdünnung in eine neue Gewebekulturflasche überführt. Das Zellkulturmedium setzte sich aus 90 % Dulbecco-modifiziertes-Medium (Bablanian et al., 1965) und 10 % fötalem Kälberserum zusammen und wurde vor der Passage in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Das alte Medium wurde verworfen und die Zellen zweimal mit PBS-d gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml 0,25-%iges Trypsin und 4 ml PBS-d lösten sich die Zellen vom Untergrund ab und wurden zwei- bis dreimal zum Vereinzeln vorsichtig aspiriert. Ein Bruchteil dieser Suspension wurde in eine frische Gewebekulturflasche überführt (HeLa: 1/5; BHK21: 1/10) und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C bis zur nächsten Passage inkubiert.

1.1.2 Passage von Suspensionskulturen

Zur Vermehrung wurden HeLa-Zellen auch in Suspensionskultur in Joklik modifizierten NEN Spinner Medium mit 10% fötalem Kälberserum unter ständigem Rühren bei 37°C vermehrt. Die Zelldichte wurde regelmäßig bestimmt und sollte zu jedem Zeitpunkt 2-4 x 10^5/ml betragen. Zur Vermehrung der Zellen und um ein Verklumpen zu vermeiden, wurden sie jeden zweiten Tag auf die erforderliche Zelldichte verdünnt.

1.2 Zellernte

Zur Ernte wurden die Zellen aus Gewebekulturflaschen nach dem Vereinzeln in ein 15 ml Weißkappreaktionsgefäß zu 2 ml frischem FCS gegeben und in einem Eisbad auf +4 °C gekühlt. Die Zellen wurden dann 7 min bei 500 g und +4 °C sedimentiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, anschließend jeweils sedimentiert und der Überstand verworfen. Das finale Zellsediment wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20 °C gelagert.

2. Virusproduktion

2.1 Inokulation von Zellen mit Viren

In humanen Zellinien benötigte Ad12 für die Produktion neuer infektiöser Virionen 72 Stunden.

2.1.1 Inokulation adhärent wachsender Zellen in Gewebekulturflaschen

Die Virusinokulation der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 50 bis 60 %.
Zunächst wurde das alte Nährmedium aus der Gewebekulturflasche komplett verworfen und 1/10 des ursprünglichen Volumens an frischem Medium eingefüllt. Anschließend wurden, je nach Zellinie, die entsprechenden Virusinokula zum Medium gegeben (HeLa: 30 Pfu pro Zelle; BHK21: 100 Pfu pro Zelle; **Pfu** = **P**laque **f**orming **u**nits = infektöse Virionen). Im 37°C Zellinkubator wurde die Gewebekulturflasche 2 Stunden lang alle 20 min geschwenkt. Anschließend wurde das Virusmedium aus der Flasche entfernt, wieder frisches Medium bis zum ursprünglichen Volumen eingefüllt und für die gewünschte Zeit bei 37°C inkubiert.

2.1.2 Inokulation von Suspensionskulturen

Zur Inokulation von Zellen in Suspensionskultur wurden diese 20 min bei 1800 UpM (Heraeus, Cryofuge 5000) und 37°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10% des Endvolumens in Joklik-Medium aufgenommen und mit etwa 20-30 Pfu pro Zelle inokuliert.

Zur Adsorption der Virionen wurde die Zellsuspension 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Joklik-Medium und 10% FCS auf das Endvolumen aufgefüllt.

2.2 Virusernte

Die Zellernte erfolgte, wenn 80 – 100 % der infizierten Zellen den **c**yto**p**hatischen **E**ffekt (CPE) aufwiesen oder bei Suspensionskulturen nach 72 Stunden.

2.2.1 Virusernte aus Gewebekulturflaschen

Das Kulturmedium wurde bis auf 1/10 des Ausgangsvolumens verworfen. Die Zellen wurden dann vom Boden der Gewebekulturflaschen durch Schlagen gegen den Handballen abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden in 500 ml Zentrifugenbecher überführt auf +4 °C abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei 500 g und +4 °C 15 min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig und in einem Zuge abgeschüttet und verworfen. Das Sediment wurde in 2 ml Tris-Saline resuspendiert und in einem 15 ml Weißkappreaktionsgefäß bei –20 °C gelagert.

2.2.2 Virusernte aus Suspensionskulturen

Die Zellsuspension wurde direkt in ein Zentrifugationsgefäß überführt. Anschließend wurde auf gleiche Weise verfahren, wie unter 2.2.1 beschrieben wurde.

2.3 Virusreinigung

Die eingefrorenen Zellen (siehe Abschnitt 2.2) wurden im Eisbad aufgetaut und danach in einem B12-Branson-Sonifier dreimal á 20 Sekunden bei 30 Watt in einem Eiswasserbad sonifiziert. Durch Mikroskopieren wurde überprüft, ob alle Zellen zerstört waren. Die Zellreste wurden dann 5 min bei +4 °C und 5700 g sedimentiert, der Überstand in ein neues Weiskappenreaktionsgefäss überführt und das Volumen mit einer Pipette bestimmt. Pro Milliliter Überstand wurden 0,5 g festes Cäsiumchlorid eingewogen und in der Suspension gelöst, so daß man eine Endkonzentration von c = 0,5 g/ml CsCl erhielt. Die Virussuspension wurde in SW60 Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben und in einer Beckman L7-55

Ultrazentrifuge mindestens 16 Stunden lang bei 40.000 Upm zentrifugiert. Die sich im CsCl-Konzentrationsgradienten ausgebildete Virusbande wurde langsam ausgetropft. Sollte aus den Virionen DNA präpariert werden, so musten die Virionen dreimal ultrazentrifugiert werden.

2.4 Bestimmung der Viruskonzentration

Die Viruskonzentration konnte mittels der optischen Dichte bestimmt werden. Hierzu wurde die Virussuspension 1:500 in Cäsiumchlorid (c = 0,5 g/ml) verdünnt. Die optische Dichte der Virionen wurde in einem Beckmann DU 640 Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Richtwert, der zur Berechnung der Viruskonzentration herangezogen wurde lag bei:

$OD_{260nm}(\text{Virus}) = 1 \Rightarrow 1*10^{10}$ Pfu/ml

(Doerfler und Burlingham, 1971)

2.5 Virus-DNA Präparation

2.5.1 Öffnen der Virionen

Zu einer gegen vier Liter TE-Puffer dialysierten Virussuspension wurde 1/10 Volumen Proteinase K (c= 10 mg/ml) sowie 1/10 Volumen 10 % SDS gegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden bei 37°C im sich langsam drehenden Reagenzglasrotator inkubiert, worauf eine DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroformreinigung (siehe Abschnitt 3.1) folgte.

3. DNA-Präparation aus Eukaryontenzellen

Zu 0,2 ml Zellsuspension werden 0,8 ml Proteinase-K Puffer sowie 100 µl Proteinase K (c = 10 mg/ml) und 100 µl 10 % SDS-Lösung gegeben. Das Gemisch wird anschließend langsam 12 bis 14 Stunden im Rotator (Reagenzglasrotator 3025) bei 37°C inkubiert.

3.1 DNA-Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

(siehe auch Diplomarbeit D.Webb (2001) für genauere Beschreibung)
Infizierte und uninfizierte Zellen in Suspension wurde mit je 1/10 Volumen Proteinase K (10 mg/ml), SDS (10%) und EDTA (250 mM) über Nacht bei 37°C inkubiert und die Proteine mit gleichem Volumen Phenol, Phenol/Chloroform (im Verhältnis 1:1) und Chloroform/Isoamylakohol (24:1) extrahiert.

3.2 DNA-Präzipitation

Zu einer DNA-Lösung wurden 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,0 sowie das 2,5-fache Volumen an –20 °C kaltem absolutem Ethanol gegeben. Man inkubierte das Reaktionsgefäß 14-16 Stunden bei –20 °C und zentrifugierte anschließend 30 min bei 10.000 Upm und +4°C in einer Sorvall RC 5B-Zentrifuge. Das Sediment wurde mit 1 ml –20 °C kalter Ethanol (70 %) gewaschen und 30 – 60 min bei RT getrocknet, bis die DNA in TE aufgenommen wurde.

3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA mittels optischer Dichte (OD)

(Freifelder und Better, 1982)
(Kaiser und Hogness, 1960)
Die Konzentration von Nukleinsäuren in wäßriger Lösung wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von λ=260 nm (OD_{260}) und λ=280 nm (OD_{280}) in Quarzküvetten bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 35 µg/ml einzelsträngiger DNA und 40 µg/ml reiner einzelsträngiger RNA. Der Reinheitsgrad einer Lösung konnte durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} ermittelt werden. Reine DNA-Präparationen ergaben einen Wert von 1,8, reine RNA-Präparationen einen Wert von 2,0. Der Wert verringerte sich bei Kontamination durch Proteine oder Phenol.

4. DNA-Analyse

4.1 Restriktionsanalyse

(Nathans und Smith, 1975)

DNA wurden mit der angemessenen Menge Enzym (3–5 U/µg für Plasmid- bzw. 5–10 U/µg für genomische DNA) unter den von den Herstellern angegebenen Bedingungen inkubiert. Plasmidrestriktionen wurden nach 60 min, Restriktionen genomischer DNA nach 16-18 Stunden durch Zugabe von 10x Stopmix beendet.

4.2 Gelelektrophorese und DNA-Visualisierung

(McDonell et al., 1977)

Zur visuellen Analyse konnte ein Restriktionsansatz im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dazu wurde der Restriktionsansatz 30 min bis 16 h in 0,7 bis 2 %igen TBE-Agarosegelen der Größe nach getrennt. Die elektrische Spannung betrug etwa 2 Volt pro cm Gellänge. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (2µg/ml) angefärbt und die entstandenen Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplexe durch UVLicht auf einem Transluminator sichtbar gemacht.

4.3 Southern Transfer Analyse

(Southern, 1975)

Das Agarosegel mit der Grösse nach aufgetrennter DNA wurde zunächst bis zum gelben Farbumschlag des Bromphenolblaumarkers maximal 25 min in 0,25 M HCl geschwenkt und somit die DNA depuriniert. Anschließendes Schwenken des Gels in 0,4 M NaOH Lösung diente zur Neutralisation bis der Bromphenolblaumarker wieder seine ursprüngliche Farbe aufwies. Zwei auf Gelgröße zugeschnittene Filterstücke (GB003) wurden auf einen Stapel Papierhandtücher gelegt. Ein in 0,4 M NaOH getränktes Filterstück und die mit ddH_2O angefeuchtete Nylonmembran wurden ebenfalls auf dem Papierstapel plaziert. Die Geltaschen wurden entfernt, bevor das Gel auf die Membran gelegt und mit zwei weiteren getränkten

Filterstücken blasenfrei bedeckt wurde. Den Abschluß bildeten zwei seitlich längere Filterstücke, die die Verbindung zur Transferlösung (0,4 M NaOH) herstellten. Der Aufbau wurde mit Plastikfolie bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach dem Transfer (mindestens 5 Stunden) wurde die Membran kurz in 2x SSC neutralisiert und anschließend 25 min bei 120°C im Hitzeschrank gebacken. Danach konnte die Membran prähybridisiert werden.

4.4 Hybridisierung membrangebundener DNA-Fragmente

Zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuren auf Nylonmembranen durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde die Membran zunächst 3 - 4 Stunden bei 65°C in Churchpuffer präinkubiert. Dem Puffer wurde noch bis zu einer finalen Konzentration von 0,1 mg/ml Heringsspermalösung zugegeben, die zuvor 10 Minuten auf 100°C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt worden war. Zur mindestens 14-stündigen Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde ebenfalls aufgekocht, kurz auf Eis gekühlt und der Hybridisierung in einem Rotationsofen zugegeben.
Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Hybridisierungsröhre einmal mit Waschlösung I ausgespült. Anschließend ließ man zuerst Waschlösung I, dann Waschlösung II je 10 Minuten bei 68°C einwirken. Zuletzt wurde die Membran noch zweimal 15 min in Waschlösung III inkubiert. Die hybridisierte Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und in Filmkassetten mit zwei Verstärkerfolien auf Röntgenfilmen (Kodak X-OMAT AR5) autoradiographiert.

4.5 Radioaktive Markierung der DNA-Sonde (Feinberg und Vogelstein, 1984)

Zur radioaktiven Markierung werden 50 ng der DNA-Sonde 5 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und im Eisbad 2 min gekühlt. Während das Reaktionsgefäß auf Eis gelagert wurde, wurden 4 µl 5x Oligonukleotidpuffer, 3 µl einer 0,5 M Stammlösung der drei nicht radioaktiv markierter Desoxyribonukleotidtriphosphate (hier dTTP, dGTP und dATP), 5 µl (50 µCi) des radioaktiv markierten α^{32}P-dCTP und 1 µl Klenowfragment der DNA-

Polymerase I (2 U/µl) dazugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C, gefolgt von 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

4.6 Polymerasekettenreaktion

(Saiki et al., 1988)

Alle durchgeführten Polymerase Kettenreaktionen (PCR; *polymerase chain reaction*) wurden in einer *Geneamp PCR-system 2400 Perkin Elmer* durchgeführt. Für die Amplifizierung von DNA wurden 100 ng genomische DNA, 25–50 pg Plasmid-DNA oder 1 ng adenoviraler DNA mit je 50 ng der jeweiligen Primer in einem Endvolumen von 25 µl eingesetzt. Die Primer waren zwischen 18 und 24 nt lang mit einem GC-Gehalt zwischen 45 bis 60 %. Der Reaktionsansatz enthielt jeweils den 10x Puffer des jeweiligen Herstellers (Promega, Sigma, Qiagen) und 0,2 mM der dNTPs. Die optimale $MgCl_2$-Konzentration wurde für jedes Primerpaar individuell bestimmt. Die Amplifikation erfolgte in 40 Zyklen des im folgenden beschriebenen PCR-Protokolls. Die Anlagerungstemperatur der jeweiligen Primerpaare wurde für diese optimiert. Die Elongationszeit wurde der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes angeglichen (ca. 1 min/kb).

Zeit (min)	Temperatur (°C)	Zyklen	Beschreibung
5	94	1	Denaturierung
0,5	94	40	Denaturierung
1	60 - 63		Binden der Primer
2	72		DNA-Synthese
7	72	1	DNA-Synthese
∞	4	-	Kühlung

Nach Beendigung der PCR wurden 5 µl DNA-Stopmix zugegeben und 10 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel aufgetrennt.

4.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

(Vogelstein und Gillespie, 1979)

Zur weiteren Analyse von DNA in Agarosegelen wurden die mittels Ethidiumbromid auf einem Transluminator sichtbar gemachten Gelfragmente zunächst ausgeschnitten und die

DNA-Extraktion mit Hilfe des Macherey-Nagel Kits „NucleoSpin Extract“, den Angaben des Herstellerprotokolls folgend, durchgeführt. Die DNA wurde mit 25 µl 10 mM Tris pH 7,5 eluiert.

4.8 DNA Sequenzanalyse

(Sanger et al., 1977)

Zur Sequenzierung von DNA wurden 300 ng PCR-Produkt oder 800 ng Plasmid-DNA zunächst mit 1/10 Volumen 3M NaOH 15 min denaturiert und anschliessend mit 1 Volumen 6M Ammoniumacetet und 4 Volumen Ethanol präzipitiert. Nach 16 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA sedimentiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und das getrocknete Sediment in 10 µl H_2O aufgenommen

Zu der DNA wurden 40 ng Primer gegeben und den Angaben des Herstellers folgend mit dem „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“ Kit in Perkin Elmers „DNA-Sequenzierer 377“ sequenziert.

5. RNA Analysen

5.1 RNA-Präparation mittels RNeasy-Kit

Die in den Versuchen verwendete RNA ist mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits der Firma Qiagen extrahiert worden. Es wurde den Anweisungen des mitgelieferten Protokolls folge geleistet, mit der Ausnahme, daß die RNA in drei 200 µl Fraktionen RNAse-freien Wassers von der Säule eluiert wurde.

5.2 DNAse-Behandlung von RNA-Proben

Zur Entfernung von DNA aus den RNA-Eluaten wurden die Proben mit DNAse behandelt. Dazu wurde der RNA-Probe 1/10 Volumen 10x DNAse-Puffer zugesetzt sowie 10 Einheiten DNAse. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde die RNA mittels Phenol-Chloroform extrahiert, mit dem Unterschied, dass das Phenol hier einen pH-Wert von 4,2

besitzt. Anschließend wurde die RNA präzipitiert, wie es unter Punkt 5.3.2 beschrieben wurde und in 30 µl RNAse-freiem Wasser aufgenommen.

5.3 RNA-Visualisierung

RNA wurde mittels Gelelektrophorese auf Degradation überprüft. 1µg RNA wurde dazu in 5 µl Wasser aufgenommen, mit 1 µl RNA-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 65°C im Wasserbad denaturiert, im Eisbad abgekühlt und schliesslich mit 1 µl RNA-Ladepuffer versetzt. Das Agarosegel wurde mit 0,5-fach konzentriertem TBE gegossen wobei gleicher Puffer auch als Laufpuffer diente. Die Proben wurden bei 50 V elektrophoretisch aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid ließen sich bei qualitativ hochwertiger RNA die Banden der eukaryotischen 28 S-, 18 S- sowie 5 S-RNA deutlich identifizieren.

5.4 RT-PCR

(Chen und Fuggle, 1993)

RNA wurde zur Amplifikation spezifischer Sequenzen zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase in DNA überschrieben, gefolgt von einer PCR-Reaktion wie sie unter Punkt 4.6 beschrieben wurde.

Zur RT-PCR wurde die RNA Matrize, dem Promega Access RT-PCR System Protokoll folgend, amplifiziert. 100 ng gesamter RNA wurden dazu mit jeweils 50 ng sequenzspezifischer Primer, je 10 mM der vier dNTPs, 10x konzentriertem Enzympuffer sowie je 5 Einheiten der AVM reversen Transkriptase und der Tfl-DNA-Polymerase versetzt. Die Magnesiumsulfatkonzentration wurde den Bedingungen der jeweiligen Primer angepasst und variierte zwischen 1 und 2,5 mM. Das finale Volumen wurde auf 25 µl aufgefüllt und der Ansatz in eine *Geneamp PCR-system 2400 Perkin Elmer* Maschine gegeben

Die Bedingungen und Teilschrittbeschreibungen eines RT-PCR-Standardansatzes sind folgender Tabelle zu entnehmen:

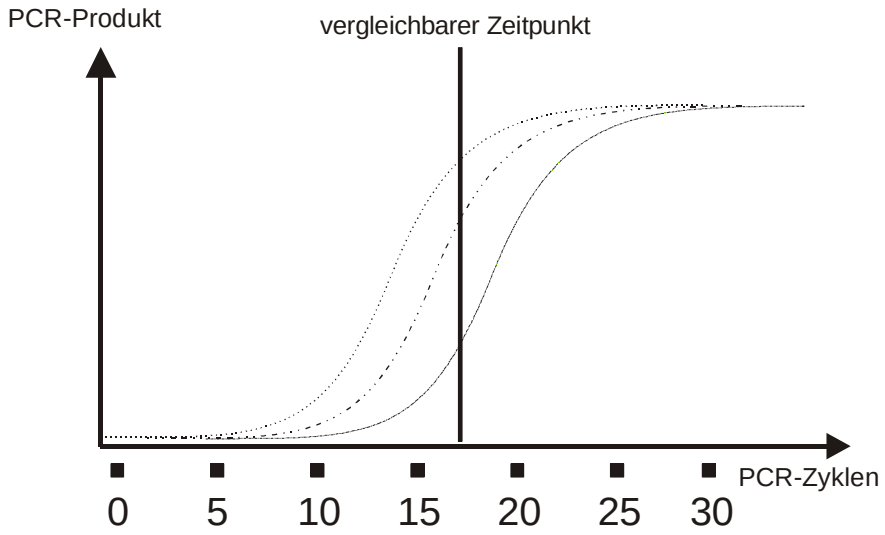
Zeit (min)	Temperatur (°C)	Zyklen	Beschreibung
45	48	1	reverse Transkription
5	94	1	Denaturierung
0,5	94	40	Denaturierung
1	63		Primerhybridisierung
2	68		DNA-Synthese
7	68	1	DNA-Synthese
∞	4	-	Kühlung

Zuletzt wurden 5 µl DNA-Stopmix zugegeben und 10 µl des Gemisches in einem Agarosegel aufgetrennt.

5.5 quantitative RT-PCR
(Siebert und Larrik, 1993; Scheuermann und Bauer 1993)

Mittels quantitativer RT-PCR lassen verschiedene Mengen einer RNA oder einer RNA-Sequenz direkt vergleichen. Dazu wird die exponentielle Phase der Sequenzproduktvermehrung betrachtet, bevor die Reaktion ihre Sättigung erreicht (Abb. C).

Ansatz und Durchführung entsprachen einem Standard-RT-PCR-Protokoll, welches aber wie folgt modifiziert wurde. Zunächst wurde die RT-PCR nach etwa 15-20 Zyklen in der exponentiellen Phase abgebrochen. Da nach dieser geringen Zahl an Zyklen die bereits vorhanden Produktmenge zu gering war, um sie mittels Ethidiumbromid sichtbar zu machen, wurde jedem Ansatz 0,1 µCi (Aktivität 3.000 Ci/mmol) radioaktiv markiertes α-^{32}P-dCTP zugegeben, um das Ergebnis falls nötig, einige Tage autoradiographieren zu können. Zuletzt wurde ein Standard in Form eines revers transkribierten Produktes im gleichen Reaktionsansatz benötigt, um die Reaktionen qualitativ vergleichen zu können. Ein zusätzliches Primerpaar für eine in allen Zelllinien spezifische β-Aktin Sequenz wurde somit zusätzlich zum Reaktionsansatz gegeben.



Theoretische Zunahme von DNA durch quantitative PCR-Amplifikation unterschiedlicher DNA-Konzentrationen.
Die eingezeichneten sigmoiden Kurven stellen die exponentielle Zunahme einer PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten dar. In vergleichbaren zu amplifizierenden DNA-Proben wird jene DNA-Amplifikation zuerst in die exponentielle Phase übergehen, welche die meisten zu amplifizierenden DNA-Sequenzen enthält (linke sigmoide Kurve). Zu einem Zeitpunkt, an dem sich alle DNA-Amplifikationen in der exponentiellen Phase befinden (vergleichbarer Zeitpunkt), lassen sich unterschiedliche DNA-Ausgangskonzentrationen bestimmen.

Nach Abbruch der Reaktion wurde der Ansatz mit 5 µl DNA-Stopmix versetz und in einem 1 %igen nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

5.6 Präparation eines nativen Polyacrylamidgels

PCR-Produkte der radioaktiven quantitativen RT-PCR wurden in nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, weil sich diese leicht trocknen und anschliessend autoradiographieren lassen.
Dazu wurde ein 1%iges natives PAA-Gel (32,5 ml ddH_2O, 2 ml 10-fach TBE, 3,5 ml Acrylamid (40 %), 0,32 ml APS (10 %), 50 µl TEMED) zwischen zwei Glasplatten bis zum Rand gegossen und ein Geltaschenformer hineingesteckt. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Geltaschen ausgespült und das Gel in 0,5-fach konzentriertem TBE Puffer etwa eine Stunde bei einer Spannung von 200 V ohne Proben elektrophoriert.. Anschließend wurden die radioaktiv markierten DNA-Proben in die Geltaschen überführt und bei 200 V der Grösse nach aufgetrennt. Das Gel wurde von den Geltaschen befreit, auf ein Whatman GB003 Saugpapier gelegt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. In einer Polyacrylamid-geltrocknungsanlage trocknete das Gel im Vakuum 45 min bei 80 °C, wurde 30 min

abgekühlt und in einer Filmkassette autoradiographiert. Alternativ wurde die Radioaktivität mittels eines BAS 1000 Radiomembrandetektors (Phosphoimager) detektiert.

6. Proteinanalyse

6.1 Proteinextraktion aus Eukaryonten

Infizierte, uninfizierte sowie auch transfizierte Zellen in einer Gewebekulturflasche wurden zweimal mit PBS-d gewaschen und dann mit einem Gummischaber abgelöst. Die Zellen wurden in ein Zentrifugengefäß pipettiert, bei 500 g sedimentiert und in 250 µl PBS-d resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl T-PER Lösung (Pierce) folgte eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Zellreste wurden bei 10.000 Upm 1 min zentrifugiert, dann der proteinhaltige Überstand in ein frisches Eppendorfzentrifugationsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

6.2 Bradford-Assay – Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Die Proteinkonzentration wurde mit Coomassie Brilliant Blue G-250 bestimmt, dessen Absorptionsmaximum sich nach Bindung an Proteine von λ=495 nm auf λ=595 nm verschob. Hierzu wurde die Coomassie Protein Assay-Lösung (Biorad) nach Vorschrift verdünnt. Für jede neue Verdünnung wurden Eichkurven mit Rinderserumalbumin erstellt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellextrakten wurden 5 µl der fraglichen Proteinlösung mit 1 ml der verdünnten Coomassie-Protein-Assay-Lösung versetzt. Nach kurzem Invertieren des Reaktionsgefäßes und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte bei 595 nm gemessen.

6.3 Erhöhung einer Proteinkonzentration („Acetonfällung“)

Zur Volumeneinengung einer Proteinlösung wurden ihr zwei Volumen –20 °C kaltes Aceton (abs.) zugegeben und die Lösung etwa 16 Stunden bei –20 °C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden 30 min bei 4 °C und 13.000 Upm in einer Heraeus Biofuge pico

sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment zwei- bis dreimal über 30 µl Diethylether getrocknet und schließlich in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen.

6.4 Trennung eines Proteingemisches durch SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine SDS-PAGE dient der gelelektrophoretischen Trennung von Proteinen nach ihrer Grösse in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Das Prinzip dieses Gelsystems besteht darin, dass verscheidene Proteine mit unterschiedlicher Oberflächenladung in denaturiertem Zustand proportional zu ihrem Molekulargewicht ein SDS-Molekül pro drei Aminosäurereste anlagern. Die dadurch resultierende negative Oberflächenladung, die für alle behandelten Proteine gleich ist, ermöglicht eine Auftrennung ausschließlich nach der Proteingrösse.
Ein SDS-Polyacrylamidgel besteht aus zwei verschiedenen SDS-enthaltenen Gelsystemen (Trenngel und Sammelgel), die sich in pH-Wert, Ionenstärke und in der Polyacrylamidkonzentration unterscheiden. Dadurch wandern die Proteine durch einen steilen Spannungsgradienten und werden am Übergang vom Sammel- zum Trenngel konzentriert.

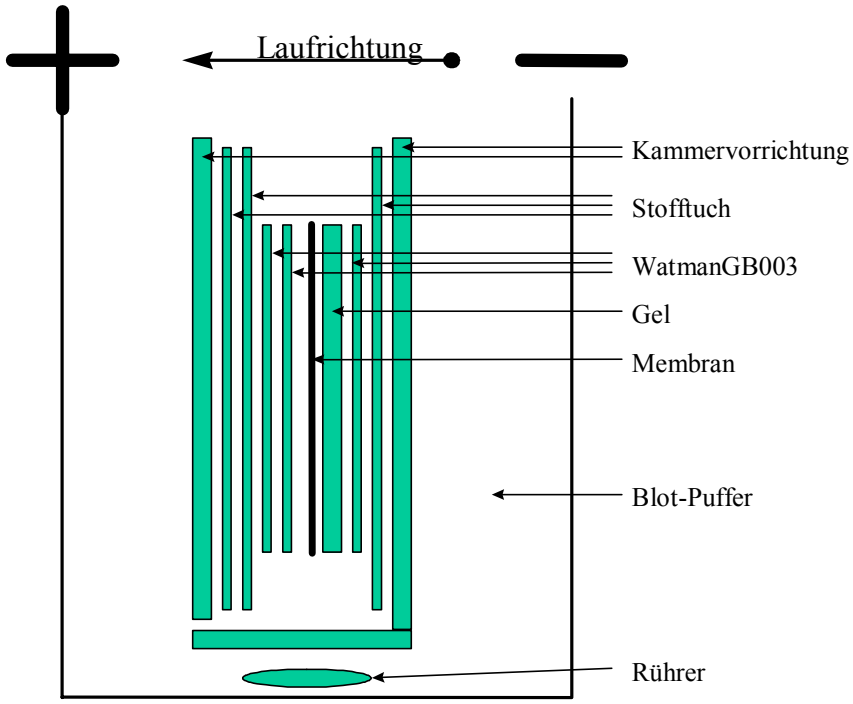
6.4.1 Gelpräparation

Eine gegebene Proteinlösung wurde mit 10 µl 4-fach konzentriertem Proteinprobenpuffer versetzt, 10 min in einem 100 °C Wasserbad erhitzt und nach Zentrifugation auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.
Für die SDS-PAGE wurden zwei gründlich gereinigte Glasplatten mit einer Mixtur aus vier ml Acrylamid (30 % plus 0,8% Bisacrylamid), 80 µl 10 %igem Ammoniumpersulfat und 8 µl TEMED abgedichtet und ein 12,5 %iges Trenngel blasenfrei eingefüllt. Die Gellösung wurde mit 2 ml Wasser überschichtet, um eine gerade Abschlussflache zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Geltaschenformer blasenfrei hineingesteckt. In die Elektrophoresekammer eingespannt wurden die Geltaschen mit Laufpuffer durchgespült und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte etwa 16 h bei einer Spannung von 60 Volt.

6.4.2 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

(Burnette, 1981)

Nach Abschluß der SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel 10 min in Blotpuffer geschwenkt, um überschüssiges SDS aus dem Gel zu entfernen. Die Proteine wurden in einer Transferkammer (BioRad) auf die PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 5 sec in Methanol, 5 min in ddH_2O und etwa 10 min in Blotpuffer inkubiert. Der Blotaufbau erfolgte blasenfrei und wie in der unten folgenden Abbildung zu entnehmen ist. Die Transfereinheit bestand aus Gel und PVDF-Membran zwischen je einer Lage „Whatman"-papier und Stofftuch, wobei das Gel in Richtung Kathode, die Membran Richtung Anode wies. Die Kammer wurde mit Blotpuffer aufgefüllt und der Proteintransfer erfolgte bei 4°C und 15 V über Nacht oder 5 Stunden bei 40 V.



6.4.3 Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran in 200 ml Blockpuffer auf einem Schüttler bei Raumtemperatur 1 h geschwenkt. Der Blockpuffer wurde gegen 25 ml frischen Blockbuffer ersetzt und der Antikörper gegen das spezifische Antigen in der Verdünnung 1:1.000 hinzu gegeben. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in Westernblot-Waschpuffer geschwenkt und danach 25 ml Blockbuffer, versetzt mit dem zweiten,

peroxidasegekoppelten Antikörper (1:5.000 verdünnt), zugegeben. Zum Abschluss folgte dreimaliges Waschen in Waschpuffer.

6.4.4 ECL-Lichtreaktion

Die zu identifizierenden Proteine wurden indirekt mittels der ECL-Lichtreaktion über die Peroxidase des zweiten Antikörpers detektiert. Das Kit zur ECL-Lichtreaktion stammte von der Firma Amersham und wurde den Herstellerangaben folgend angewandt. Zum Schluss wurde die Membran in Frischhaltefolie verschweißt und in einer Filmkassette autoradiographiert. Die Expositionsdauer bei dieser Detektionsmethode betrug einige Sekunden bis wenige Minuten.

7. Klonierungstechniken

7.1 PCR-Amplifikation des menschlichen CAR-Rezeptor Gens

(siehe auch Smith und Johnson, 1988)

Ausreichende Mengen des menschlichen CAR Rezeptors wurden mittels PCR Amplifikation hergestellt. Die 5'-Primerenden waren dabei mit Restriktionserkennungssequenzen ausgestattet worden, wie sie auch im Expressionsvektor pEGFP der Firma Clontech zu finden waren. Die PCR-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt, wieder extrahiert und in 30 µl ddH_2O eluiert.

7.2 Klonierung des PCR-Fragmentes in den Expressionsvektor

7.2.1 Restriktion der PCR-Fragmente und des Vektors

Der Expressionsvektor pEGFP sowie die DNA Fragmente wurden in einzelnen Ansätzen mit den Enzymen *NheI* und *BamH1* den Herstellerangaben folgend restriktionsgeschnitten, so dass das GFP-Protein entfernt und der hCAR-Rezeptor direkt unter die Kontrolle des CMV-Promotor insertiert wurde. Die DNA wurde schliesslich in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert, um kurze DNA Reste zu entfernen.

7.2.2 Ligation

Vom exonukleolytisch gespaltenen Vektor wurden 100 ng sowie 25 ng des gespaltenen PCR-Fragmentes in 17 µl ddH_2O aufgenommen. Es werden nun 2 µl Ligasepuffer sowie 1 µl T4-Ligase (5 Einheiten) beigemischt und 14 Stunden bei 16 °C im Wasserbad inkubiert.

7.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

(Hanahan, 1983)

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurde eine XL1-blue Kolonie in 1,5 ml SOB-Medium aufgenommen und in einem 15 ml Reagenzglas über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden 0,5 ml in 500 ml SOB-Medium verdünnt und und solange bei 37°C weitergeschüttelt, bis die optische Dichte der Bakteriensuspension OD_{550nm} = 0,7 - 0,8 betrug. War die Suspension danach in einem Eisbad auf 4°C abgekühlt, wurde 10 min bei 4.500 Upm (JA-10 Rotor in J2-21 Zentrifuge) und +4 °C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde dann in 50 ml Glycerinlösung (10 % in ddH_2O) durch kräftiges kreisförmiges Schütteln des Zentrifugenbechers resuspendiert und die Suspension mit Glycerinlösung auf 500 ml aufgefüllt. Der Zentrifugationsschritt wurde einmal wiederholt. Danach wurden die Bakterien wieder durch Zentrifugation bei 4.500 Upm (JA-10 Rotor in J2-21 Zentrifuge) und +4 °C 10 min sedimentiert und in insgesamt 2 ml einer 10 %igen Glycerinlösung resuspendiert. Das Ergebnis war eine Zellkonzentration von etwa 3 x 10^{10} Zellen pro ml. Die Zellsuspension wurde in 40 µl-Einheiten in 500 µl Reaktionsgefäße aufgeteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -70°C hielt sich die Elektrokompetenz etwa 6 Monate konnte durch Elektroporation von 50 pg Plasmid-DNA getestet werden.

7.4 Elektroporation / Transformation

(Neumann et al., 1982)
(Kaiser und Hogness, 1960)

Zur Elektroporation wurden 1 ml SOC-Medium pro Elektroporationsansatz in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden wenige Minuten bei RT aufgetaut und dann im

Eisbad gelagert, bis 1 bis 3 µl DNA-Lösung zugegeben und vermischt wurden. In eine eisgekühlten Küvette überführt wurde die Suspension durch Klopfen auf einen harten Untergrund von eventuellen Luftblasen befreit und elektroporiert (25 µF; 200 Ω und 1,66 kV bei einer Pulsdauer von 4,5 bis 5 msec). Die Zellen wurden danach schnellstmöglich in SOC-Medium aufgenommen und zur Regeneration 60 min auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. 200 µl der Bakteriensuspension wurden auf Selektionsmedium (100µg/ml Ampicillin) plattiert, so dass Transformierte Bakterien in 12 bis 18 Stunden im Brutschrank bei 37 °C zu Kolonien heranwuchsen.

7.5 Kochlyse und Restriktionskontrolle

(Holmes und Quigley, 1981)

Aus Bakterienkolonien wurde mittels der Kochlyse Plasmid-DNA isoliert und diese durch anschließende Restriktionskontrolle überprüft.

Zur Kochlyse wurden einzelne Kolonien in jeweils 1,5 ml selektiven Mediums (2xYT mit Ampicillin) überführt Und über Nacht auf einem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur 1 min bei 13.000 Upm in einer Heraeus Biofuge Pico bei RT sedimentiert und der Überstand vollständig verworfen. In 0,5 ml STET-Puffer und 40 µl Lysozym-Lösung (c = 10 mg/ml) resuspendiert wurde das Gemisch 90 sec. bei 100 °C im Wasserbad gekocht. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min Dauer bei einer Geschwindigkeit von 13.000 Upm und Raumtemperatur in einer Heraeus Biofuge Pico. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß geschüttet, in dem sich 0,5 ml Isopropanol (abs.) und 40 µl 3M Natriumacetat (pH 4,8) zur Präzipitation der DNA befanden. Das Gemisch wurde kurz geschüttelt und 12 min bei 13.000 Upm und RT zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 0,5 ml Ethanol (70 %) gewaschen, 60 min an der Luft getrocknet und 20 µl RNAse A (c = 0,33 mg/ml) hinzugegeben.

Zur Restriktionskontrolle wurde 1 µl der Lösung abgenommen, mit *BamHI* und *Nhe1* gespalten und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Restriktionspositive Klone wurden sequenziert. Die Sequenzierprimer (Material Anschnitt 10) wurden in der Art ausgewählt, daß das klonierte Fragment und ein Stück des Vektors zu beiden Seiten des Fragmentes sequenziert werden. Somit wurde überprüft, ob sich einerseits das klonierte PCR-Produkt in richtiger Ausrichtung im Vektor befand, und ob andererseits Mutationen auch an den Schnittstellen aufgetreten waren.

8. Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe eines geeigneten spezifischen Antikörpers können Proteine oder Proteinagglomerate mittels der Immunfluoreszenzfärbung *in vivo* durch ein Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.
In eine Gewebekulturschale (∅ 6 cm) wurde ein durch Ethanol sterilisiertes Deckgläschen und 1,5 x 10^6 Zellen in 5 ml Medium gegeben. Die Schale wurde im Inkubator mit 5 % CO_2–Anteil in der Luft bei 37 °C inkubiert. War der Zellrasen zu etwa 50 % konfluent, wurde das Deckgläschen durch 8 – 10 maliges Eintauchen in drei PBS gefüllte Bechergläser gewaschen. Dieser Waschschritt wurde nach allen folgenden Inkubationen durchgeführt. Die auf dem Deckgläschen haftenden Zellen wurden 15 min bei RT in Paraformaldehyd (2% in PBS pH 7,4) fixiert, danach 10 min in Glycin (0,1 M) inkubiert, 15 min lang in Triton X-100 (0,1 % in PBS) geöffnet und schließlich 30 min bei RT im Blockpuffer inkubiert. Danach banden für jeweils 30 min der erste, dann der zweite Antikörper in geeigneter Verdünnung im Blockpuffer an ihre Antigene. Nach dem letzten Waschschritt wurde Restflüssigkeit weitestgehend entfernt. Auf einen Objektträger wurden jetzt 20 µl DABCO gegeben, und das Deckgläschen mit den Zellen nach unten zeigend blasenfrei darauf gelegt. Überschüssige Flüssigkeit entfernte man durch sanften Druck mit einem saugstarken Papier und versiegelte das Deckgläschen an den Rändern mit Nagellack.

9. Detektion neusynthetisierter adenoviraler DNA

Ziel ist es, in Ad12 infizierten Zellen neusynthetisierter DNA detektieren zu können, um virale DNA Replikation nachzuweisen.

9.1 Transfektion des menschlichen CAR-Rezeptors in BHK21 Zellen

Alle folgenden Schritte der Transfektion wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Waren BHK21 Zellen in einer 75 cm² Gewebekulturflasche zu etwa 80% konfluent gewachsen, wurden sie mit Trypsin geerntet und zweimal mit 5 ml PBS-d, dann mit 5 ml RPMI 1640 Medium (37 °C) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellsediment in 5 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert, 0,5 ml der Zellsuspension (etwa

10^6 Zellen) in eine Transfektionsküvette zu 10 µg (1µg/µl) des zu transfizierenden Vektors gegeben und kurz gemischt. Die Transfektion erfolgte bei 300 V und 960 µF mit einer Pulsdauer von 22 ms. Sofort nach dem Puls wurden die Zellen in frischem Kulturmedium bei 37 °C im CO_2-Schrank inkubiert. 24 h später inokulierte man die BHK21 Zellen mit 100 Pfu Ad12 pro Zelle.

9.2 BrdU Markierung replizierender DNA

28 Stunden nach der Infektion wurde dem Kulturmedium 10 µM BrdU zugesetzt und ließ das Basenanalogon für die Dauer von 2 h in die DNA einbauen. Nach der Zellernte wurden die Zellen einmal in 5 ml PBS-d gewaschen, dann bei 500 g sedimentiert und schließlich etwa $5x10^5$ Zellen in 100 µl PBS-d resuspendiert.

9.3 Alkalischer Sucrosegradient

In ein Polyallomer Ultrazentrifugenröhrchen mit den Ausmaßen 14 x 89 mm wurde ein 1 ml CsCl-Kissen vorgelegt. Es folgte ein alkalischer Sucrosegradient (20 – 5 %ig) im Volumen von 10 ml, der mittels Gradientenmischer ganz vorsichtig auf das CsCl-Kissen geschichtet wurde. Zum Abschluß gab man 150 µl Lysispuffer oben auf. Die Zellen wurden dann vorsichtig auf den Lysispuffer pipettiert und der Gradient zur Zelllyse 16 h bei 4°C gelagert. Anschliessend wurde in einem SW41 Rotor 3 h bei 4°C und 35.000 Upm ultrazentrifugiert und die DNA der Grösse nach sowie von Zellresten separiert. Der Gradient wurde zuletzt in etwa 300 µl Fraktionen ausgetropft und durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M HCl neutralisiert. Es wurden noch 10 µg Heringssperma DNA pro Fraktion beigemischt und die DNA mittels Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAcetat und dem 2,5 fachen Volumen absoluten Ethanols (muss Raumtemperatur haben!!) über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die sedimentierte, mit 70%-igem Ethanol gewaschene und letztlich getrocknete DNA wurde in 7 µl H_2O aufgenommen. Durch Zugabe von 1 µl 5 M NaOH denaturierte die DNA wieder und 3 µl wurden auf eine Nitrozellulosemembran (Roche) gespottet, welche 25 min bei 120°C im Ofen gebacken wurde.

9.4 Detektion von BrdU inkorporierter DNA durch Anti-BrdU-Antikörper

Dieser Schritt gleicht dem Punkt 6.4.3 vollständig, mit der Ausnahme, dass der erste Antikörper ein Kaninchen-anti-BrdU-Antikörper der Firma Sigma war, der 1:200 in 20 ml Blockpuffer verdünnt wurde.

10. Einzelsträngige DNA Arrays

Da komplementäre Adenovirus Sequenzen beider DNA Stränge für Leseraster codieren, wurden mittels folgendem Protokoll Einzelstrangabschnitte für die Analyse viraler Transkrptionsmuster generiert.

Ad12 spezifische DNA Fragmente der Ad12 offenen Leseraster wurden mittels PCR amplifiziert und in den Phagenvektor M13mp18 kloniert. Dazu wurden bereits die PCR-Primer derart mit Restriktionsschnittstellen zur Vektorklonierung versehen, dass später der zur mRNA identische M13-Ad12 DNA Einzelstrang isoliert werden konnte.
Die replikative doppelsträngige Form des M13 Vektors sowie die PCR Produkte wurden exonukleolytisch geschnitten. Die jeweiligen Restriktionsenzyme der zu klonierenden Fragmente sind der Tabelle im Materialteil (Punkt 10: Primer) zu entnehmen. Letztlich wurden die einzelnen Fragmente mit dem Vektor in einem Volumen von 20 µl ligiert (Abschnitt 7.2.2).
Eine XL1-blue Übernachtkultur verdünnte man 1:10 in dYT-Medium und ließ die Bakterien 60 min bei 37°C wachsen. Derweil wurden 100µl XL1-blue transformationskompetente Bakterien der Firma Stratagene mit 10 µl des Ligationsansatzes vermischt 30 min auf Eis gelagert, dann 90 sec bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort wieder 2 min auf Eis gekühlt. Zu einem Reagenzglas mit 3 ml Weichagar in einem 45°C Wasserbad gab man rasch 200 µl der schüttelnden XL1-blue Kultur, 100 µl der transformierten Bakterien, 50 µl X-Gal (20 mg/ml) sowie 10 µl IPTG (100 mM). Es wurde kurz gemischt und alles auf einer LB-Agarplatte gleichmässig verteilt. Nach der Übernachtinkubation bei 37°C wurden weisse Plaques gepickt und zu einer 1:100 verdünnten XL1-blue Übernachtkultur in dYT-Medium gegeben. Man ließ die Bakterien und Phagen 5 h bei 37°C inkubieren, zentrifugierte die Bakterien dann 2 min bei 13.000 UpM und isolierte mit dem „ssDNA purification Kit“ von Qiagen, den Angaben des Herstellers folgend, die einzelsträngige DNA aus dem Überstand.

Aus den Bakterien wurde per Kochlyse die DNA isoliert und mit Standard M13 Primern das gesamte klonierte Fragment sequenziert.
Die einzelsträngige M13-Ad12 DNA wurde in 0,4 M NaOH und 5 mM EDTA denaturiert und 20 ng für HeLa Arrays sowie 100 ng für BHK21 Arrays auf eine positiv geladene Nylonmembran gespottet. Die Membran wurde schliesslich 25 min bei 120°C im Ofen gebacken.
Zur Reversen Transkription und der radioaktiven Markierung der cDNA mit ^{32}Phosphor wurden 5 µg gesamtzellulärer RNA mit 2 µg oligo-dT Primern und je 1 mM der drei dNTPs (dGTP, dATP und dTTP) gemischt, dann 5 min bei 65°C denaturiert und im Eisbad gekühlt. Nach Zugabe von 5 µCi (α-^{32}P)-dCTP (3000 µCi/mmol), 10mM DTT, 10x Reaktionspuffer und 300 Einheiten der Superscript II Reversen Transkriptase wurde der Ansatz 90 min bei 42°C inkubiert. Die Proben wurden in Sephadex G-50 Säulen chromatographisch von freien Nukleotiden gereinigt und für eine Dauer von 20 h in DIG Hybridisierungspuffer bei 42°C an die membrangebundene M13 Einzelstrang-DNA hybridisiert. Anschliessend wurde die Nylonmembran dreimal 20 min in 0,5 x SSC und 1% SDS bei 65°C gewaschen und autoradiographiert (HeLa x Ad12 – 14 h; BHK21 x Ad12 – 48 h).

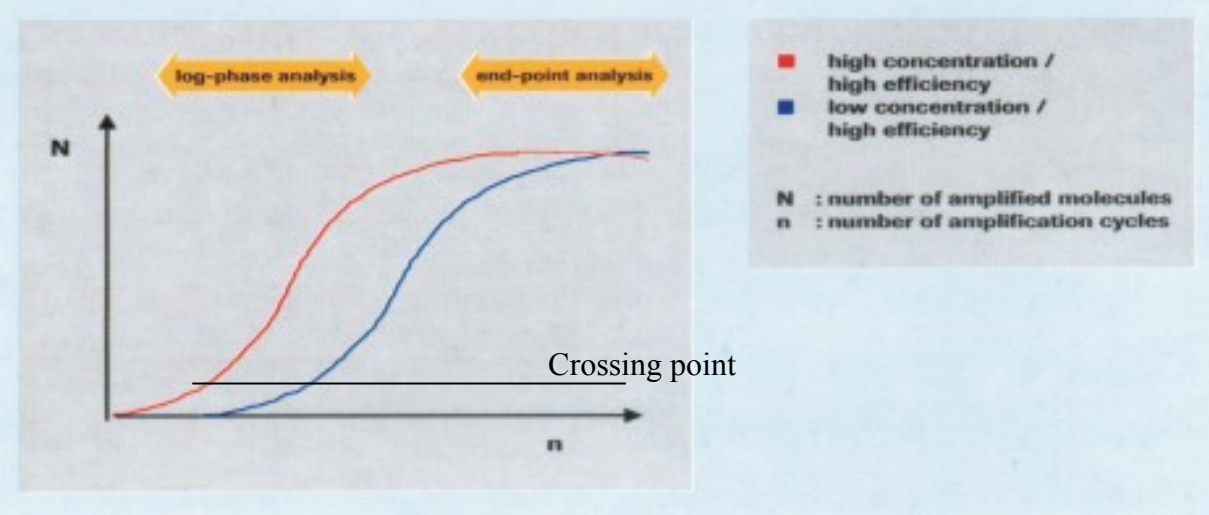
11. Nukleinsäurequantifizierung mit Roches LightCycler

Mit dem LightCycler der Firma Roche lassen sich unterschiedliche Mengen an vorhandener DNA oder auch transkribierter RNA in verschiedenen Zellsystemen quantifizieren.

11.1 Quantitative PCR

In mit Ad12 infizierten BHK21 und HeLa Zellen soll jene Menge viraler DNA quantifiziert werden, die nach der Virusinokulation bis in den Zellkern transportiert wurde. Dazu wurden infizierte, mock infizierte sowie hCAR transfizierte und anschliessend infizierte Zellen einer Gewebekulturschale mit Trypsin geerntet, auf 4°C gekühlt und nach der Zentrifugation zweimal mit kaltem PBS-d gewaschen. Die Zellen wurden dann in 0,5 ml Kernextraktionspuffer (4°C) für eine Dauer von 5 min auf Eis inkubiert und weitere 5 min bei 4°C und maximal 500 g sedimentiert. Das Kernsediment wurde einmal mit PBS-d gewaschen und die DNA mittels Phenol-Chlorophorm Reinigung extrahiert.

Zur quantitativen PCR Analyse wurden 100 ng der DNA mit je 50 ng Primern und 2 µl Reaktionsmix zu einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Die Reaktion fand in einer LightCycler PCR Machine der Firma Roche statt. Nach jedem Elongationsschritt der PCR band das im Mix befindliche „Sybr Green 1" spezifisch an doppelsträngige DNA. Imitiertes Licht einer Wellenlange von 488 nm wurde dann mit 530 nm messbar emittiert. Die Zunahme an doppelsträngiger DNA in der Reaktion konnte somit durch die Zunahme emittierten Lichts verfolgt werden. Entstehende sigmoide Kurven der Produktvermehrung (Abb. unten) liessen auf die Startmenge der zu amplifizierenden Sequenz schliessen. Je früher eine Kurve in die log-Phase geht, desto mehr Ausgangsmaterial war vorhanden. Der direkte Vergleich zweier Kurven geschah an einem sogenannten „crossing point" in der log-Phase, an dem gleiche Fluoreszenzmengen für alle Amplifikationen auftraten.



Alle LightCycler Amplifikation wurden mit LightCycler Version 3.5 Software der Firma Roche ausgewertet.

11.2 Quantitative „two step" RT-PCR

Zur Quantitativen Analyse von RNA Transkripten wurde gesamtzelluläre RNA mittels Qiagen RNeasy Kits, den Anweisungen des Herstellers folgend, isoliert. 500 ng RNA wurden anschliessend mit 300 Einheiten Superscript III und oligo-dT Primern in cDNA überschrieben. 1/10 Volumen cDNA (2 µl) wurden zur quantitativen PCR mit Sybr Green 1 eingesetzt und die Ergebnisse mit Roches LightCycler Version 3.5 Software ausgewertet.

Das Ergebnis für die Quantitative RT-PCR wurde immer als relatives Verhältnis dargestellt

$$\frac{\text{Zielnukleinsäure}}{\text{Referenznukleinsäure}}$$

Dieses hat mehrere Gründe:

1. Unterschiede der Anfangsmenge an RNA
2. Unterschiede der RNA Qualität (Degradation der RNA)
3. Effizienzvariationen in der cDNA Synthese
4. Pipettierfehler

Eine Referenznukleinsäure ist in der Regel ein Housekeepinggen, dessen Expression auch bei unterschiedlichen inneren oder äusseren Einflüssen unverändert bleibt. Daher kann die Amplifikation der Zielnukleinsäure zu der der Referenznukleinsäure normalisiert werden.
Die optimale Effizienz, mit der eine Nukleinsäuresequenz amplifiziert werden kann beträgt den Wert 2, wenn jede Nukleinsäure einmal pro Zyklus amplifiziert wird und folgende Formel vorausgesetzt wird:

$$\mathbf{N = N_0 \times 2^n}$$

N = Anzahl der DNA Moleküle nach n Zyklen
N_0 = Anzahl der DNA Moleküle vor dem ersten Zyklus
n = Anzahl der Zyklen

In der Realität aber arbeiten verschieden Faktoren gegen eine optimale PCR, wie z.B.

- Kompetition von Primern und bereits amplifiziertem Produkt an gleiche Sequenzen zu binden.
- abnehmende Reagenzkonzentrationen während der PCR.
- Enzyminstabilität.
- Produktinhibition.

Aber auch Unterschiede in der Amplifikationseffizienz zwischen Ziel- und Referenznukleinsäure können auftreten durch:

- Unterschiedliche Effizienz der cDNA Synthese.
- Verschiedene Fragmentlängen.
- Diversen GC-Gehalt.
- ...

Durch einen sogenannten Kalibrator können das Optimum begrenzenden Faktoren jedoch relativiert werden. Ein Kalibrator ist daher eine Versuchanordnung, die der Normalisierung der Endresultate dient. Er kompensiert konstante Fehler zwischen der Amplifizierung von Ziel- und Referenznukleinsäure und stellt einen Bezugspunkt zwischen verschiedenen PCR Läufen. Die oben beschriebene Formel erweitert sich somit wie folgt:

Normalisierter Quotient:

$$\frac{\text{Konz.d. Zielnukleinsäure (Probe 1)}}{\text{Konz. d. Referenznukleinsäure (Probe 1)}} \bullet \frac{\text{Konz.d. Zielnukleinsäure (Kalibrator)}}{\text{Konz. d. Referenznukleinsäure (Kalibrator)}}$$

In unserem konkreten Fall haben wir die cDNA von Ad12-infizierten HeLa Zellen als Kalibrator gesetzt. Für beide PCR Läufe, also für Ziel- und Referenzgen, wurden mindestens 3 Verdünnungen untersucht. Das Referenzgen war immer eine PCR mit β-Aktin Primern, die Zielnukleinsäuren waren die Gene für z.B. E1A oder das Pentonprotein. Daher musste hier die cDNA der Ad12-infizierten HeLa Zellen als Kalibrator eingesetzt werden, da beide diese Probe immer Ziel- sowie auch Referenzgen enthielt. Eine Versuchsrechnung für einen konkreten Fall sieht somit wie folgt aus:

Normalisierter Quotient für E1A Transkription der hCAR transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen:

$$\frac{\text{E1A (hCAR - BHK21 x Ad12)}}{\text{β-Aktin (hCAR - BHK21 x Ad12)}} \bullet \frac{\text{E1A (HeLa x Ad12)}}{\text{β-Aktin (HeLa x Ad12)}}$$

Alle PCR Amplifikationen der 3 Kalibratorverdünnungen werden von der Software gemittelt und ergeben eine Standardkurve. Diesen Kalibrator-Standardwerten weist die Software automatisch den Wert 1 zu, die Ergebnisse der Proben-PCR-Analysen werden dazu in Relation gesetzt.

12. ImmunoFISH

DNA sowie auch Proteine lassen sich simultan in einem Präparat fluoreszenztechnisch darstellen, wie in diesem Fall das Ad12 präterminale Protein und die Ad12 DNA.

12.1 Fluoreszensmarkierung der DNA

Zur DNA Detektion wurde zunächst eine fluoreszensmarkierte Sonde hergestellt. Die Sonde sollte möglichst gross, aber frei von fremder DNA sein. Die Wahl fiel auf das Ad12 *EcoRI-B* Fragment und wurde restriktionsendonukleolytisch aus dem Vektor pBR322 gespalten. 2µg des Fragmentes wurden in 300 µl TE aufgenommen und die DNA 10 mal 15 sec lang auf Eis sonifiziert. Die DNA wurde mit 3M NaAcetet präzipitiert, gewaschen und getrocknet. Die Markierung der DNA Fragmente erfolgte mit dem „Ulysis Alexa Fluor 546 nucleic acid labeling Kit“ der Firma Molecular Probes nach Anweisung des Herstellers. Die DNA wurde zuletzt nochmals präzipitiert, um freie Nukleinsäuren und Farbmoleküle zu entfernen. Die Sonde wurde 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert und auf Eis gekühlt bevor sie zu den Zellen gegeben wurde.

12.2 Präparation und Färbung der Proteine und der DNA

Halbkonfluent gewachsene infizierte und mockinfizierte Zellen auf einem Deckgläschen wurden identisch nach dem Protokoll „Immunfluoreszenzfärbung“ (Abschnitt 8) präpariert. Nachdem die Zellen 30 min der 2. Antikörperlösung ausgesetzt waren, folgte eine 30 min Inkubation in 50 mM EGS bei 37°C, gefolgt von 60 min in 100µg/ml RNAse (in 2xSSC). Die DNA denaturierte dann 2 min in einer NaOH-Lösung (pH 12) bis die Zellen in 15µl Hybridisierungspuffer gelegt wurden, die 200ng der markierten und denaturierten Sonde enthielten. Die Sonde hybridisierte über Nacht bei 37°C in einem vom Licht verschlossenem Feuchtigkeitsbehälter. Es wurde nun je 30 min ohne Agitation erst in 2xSSC bei 37°C, dann 2xSSC bei RT und letztlich in 1xSSC bei RT gewaschen und die Deckgläschen auf einem Objektträger mit DABCO versehen und mittels Nagellack fixiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte an einem Zeiss LSM 4 Mikroskop.

13. Immunopräzipitation von intrazellulärer Ad12 DNA mittels Ad12-pTP Antiserum

BHK21 Zellen wurden mit den Genen für das Ad12-pTP, das Ad12-E1A oder das Ad2-E1A nach gleichem Protokoll, wie es unter 9.1 beschrieben ist, transfiziert. 18 h nach der Elektroporation wurden die BHK21 Zellen mit 100 PFU Ad12 pro Zelle infiziert, HeLa und C131 Zellen wurden mit 25 oder 100 PFU Ad12 pro Zelle infiziert. Schein-infizierte BHK21 Zellen, nicht transfizierte aber Ad12-infizierte BHK21 Zellen, sowie Ad12-infizierte oder schein-infizierte HeLa oder C131 Zellen dienten als Kontrollen. Etwa 10^7 Zellen wurden 28 h p.i. oder nach schein-Infektion in eiskaltem PBS resuspendiert, welches 1 % Igepal CA-630, 0.1 % SDS und 4 mM Pefabloc SC Protease Inhibitor enthielten. Die Zellen wurden 2 min in einem Branson B-12 Sonifiziergerät aufgebrochen. Nachdem Zellüberreste entfernt waren, wurden die Zellextrakte 1 h bei 4°C mit 1.0 µg Kaninchenimmunglobulinen und 20 µl der Protein-A-Agarose inkubiert. Anschliessend wurde bei 1000 g zentrifugiert und das Lysat bei 4°C für 16 h unter Rotation mit 15 µl des Ad12-pTP Kaninchen Antiserums und 30 µl der Protein-A-Agarose inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 g gesammelt und 4 Mal mit PBS gewaschen. Zum Lösen der Ad12 DNA vom Antikörper-Agarose Komplex wurde das Sediment in 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-2 mM EDTA-10 mM NaCl-1 % SDS gelöst und 3 h lang bei 55 °C mit 1 µg/ml Proteinase K versetzt. Die Agarose wurde durch Zentrifugation entfernt, und der Überstand wurde zur Präsenz der Ad12 DNA mittels Dot Blot Prozedur analysiert. Dazu wurden Aliquote der DNA-Überstände mit einer Lösung aus 0.4 M NaOH und 5 mM EDTA behandelt und auf einer positiv geladenen Nylonmembran fixiert. Hybridisiert wurde mit ^{32}P-markierter Ad12 DNA nach oben beschriebener Methode (Abschnitte 4.4 und 4.5).

14. Plaque Test

A549 Zellen werden bei einer Konfluenz von 75 % in „6-well-Platten“ mit 400µl einer Virusverdünnung bestehend aus Virus, Zellkulturmedium und FCS inokuliert. Kontrollzellen werden ohne Virus schein-infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C wird der Überstand abgenommen und durch 3 ml Plaque Medium (0.6 % Sea Plaque GTG Agarose in DMEM und 5 % FCS) ersetzt. Die 6-well Platten werden 30 min bis zur Erstarrung der Agarose offen in einer Sterilwerkbank bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 72 h wird ein weiterer Milliliter frisch angesetztes Plaquemedium zu jedem Versuch gegeben. Am 7. Tag nach der Infektion werden die Versuchsansätze durch Zugabe von je 2 ml einer Lösung

bestehend aus DMEM 1.2 % Sea Plaque GTG Agarose und 0.01 % Neutrale Rot Lösung (Sigma N 2889) gefärbt. Ad12 Plaques werden etwa 2 bis 5 Tage nach der Färbung sichtbar.

D. Ergebnisse:

1. Allgemeine Infektionen des Adenovirus Typ 12

In Hamster injiziertes humanes Adenovirus Typ 12 (Ad12) ist hoch oncogen. Doch wie kommt es zu der Tumorbildung in den Nagern, wenn Ad12 im Menschen lediglich leichte Infektionen der oberen Atemwege hervorruft, und bisher keine menschlichen Tumore auf Ad12 zurückzuführen sind. Die Vermutung liegt nahe, dass die abortive Infektion von Ad12 in Hamsterzellen, und die Möglichkeit der Integration Ad12 viraler DNA ins Nagergenom, ausschlaggebend für ein Entarten der Zelle ist. Die humanen Adenoviren Typ 2 (Ad2) oder Typ 5 (Ad5) hingegen können Nagerzellen produktiv infizieren. Jede Zelle wird somit am Ende des Infektionszykluses zerstört. Welche Gegebenheiten der Hamsterzelle, oder welche Unvermögen des Ad12 machen eine Infektion des Virus in Nagerzellen abortiv?
Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass im abortiven System Ad12 DNA Genome bis in den Nukleus von Hamsterzellen gelangen, dort auch einige der frühen Funktionen exprimiert werden, aber keine DNA Replikation stattfindet. In HeLa Zellen hingegen beginnt die Phase der Ad12 viralen DNA-Replikation etwa 16 bis 20 Stunden nach der Infektion (h p.i.) (Diplomarbeit Dennis Webb, 2001). Virale DNA Replikationszentren (Abb. 5) in den Zellkernen Ad12 infizierter HeLa Zellen konnten durch simultane Färbung Ad12 viraler DNA (rot, Ulysis 546 nm, Abb. 5, Spalte 3) sowie des Ad12 viralen pTP/TP (grün, Alexa 488 nm, Abb. 5, Spalte 2) gezeigt werden. Die Färbungen liessen eindeutige Colokalisation von DNA und Protein erkennen (Abb. 5, Spalte 4, Überlagerung). Vergleiche mit den Phasenkontrastbildern machten deutlich, dass nicht alle Zellen infiziert wurden, oder dass die virale DNA-Replikation noch nicht in allen Zellen begonnen hatte.

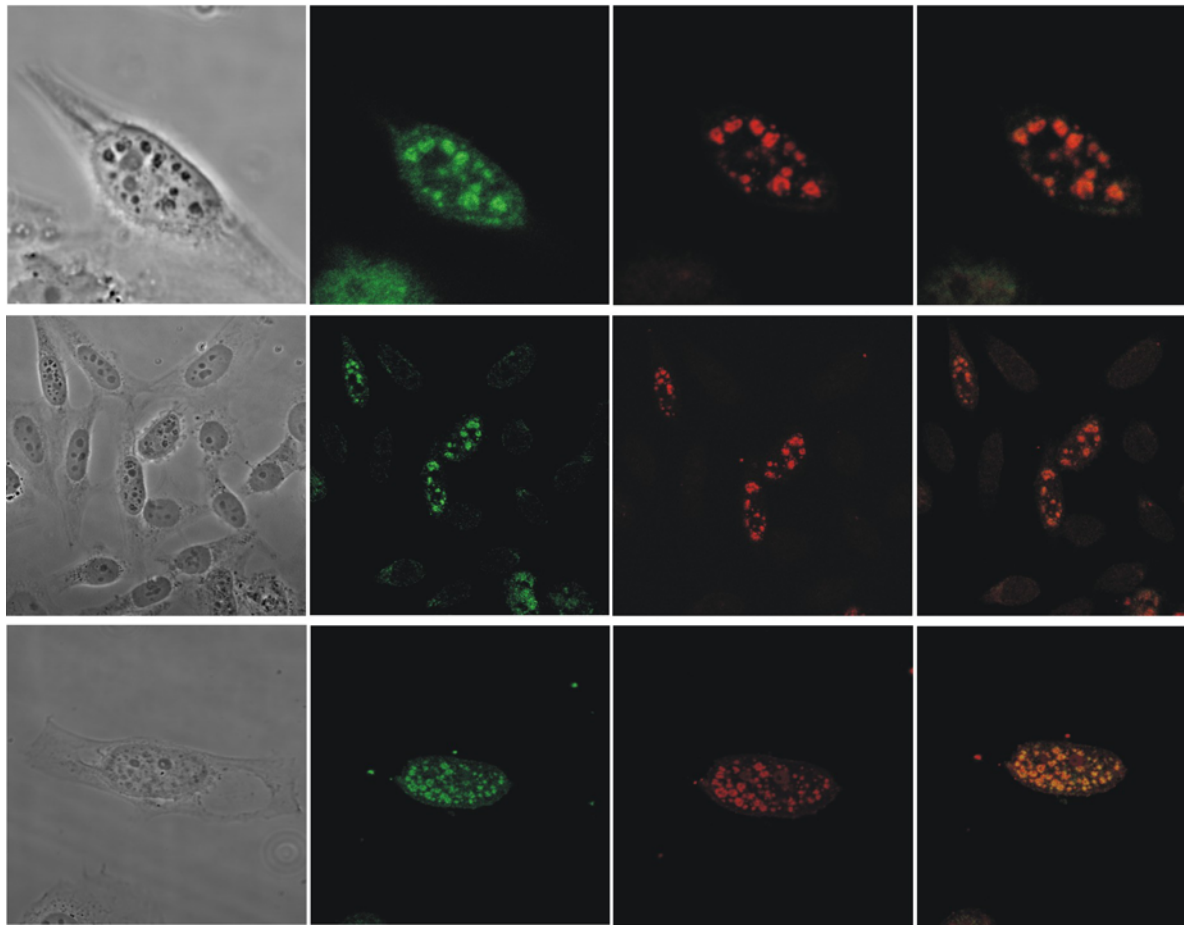


Abb. 5
Detektion von Ad12 Replikationszentren.
Ad12 infizierte HeLa Zellen wurden mit einem polyklonalen anti-Kaninchen Antikörper gegen das Ad12 terminale Protein (TP) immunofluoreszenztechnisch gefärbt (grün), und gleichzeitig durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit dem *EcoRI*-B Fragment der Ad12 DNA (rot) markiert (siehe Material und Methoden).

2. Arrayanalyse früher Ad12 viraler Transkription

Die Expressionsmuster Ad12 viraler Gene in produktive Ad12-infizierten menschlichen HeLa Zellen und abortiv Ad12-infizierten BHK21 Hamsterzellen (BHK = engl. Baby Hamster Kidney Cells) unterscheiden sich signifikant. Diesen Überblick erhielten wir durch Transkriptionsmuster von Ad12-infizierten HeLa oder BHK21 Zellen welche zu verschiedenen Infektionszeitpunkten erstellt wurden. Auf eigens hergestellte Nylonmembran-Arrays wurde dazu M13 klonierte einzelsträngige DNA von 28 Ad12 offenen Leserastern aufgetragen. Die Arrays wurden mit radioaktiv markierter cDNA von revers transkribierter, gesamtzellulärer RNA von schein- oder Ad12 infizierter Zellen hybridisiert. Das

Transkriptionsmuster der produktiv Ad12-infizierten menschlichen HeLa Zellen ist in Abb. 6a wiedergegeben.

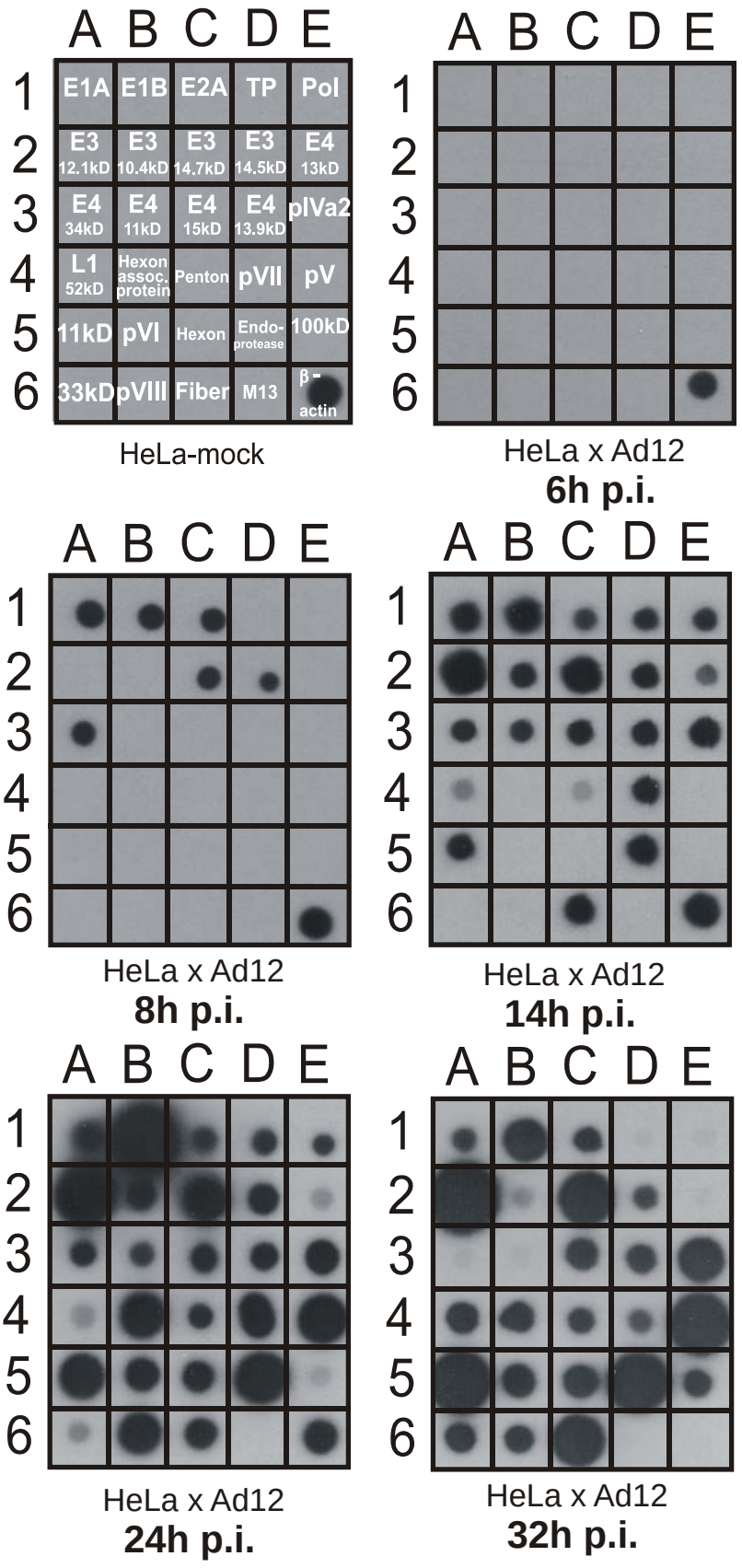


Abb. 6a
Transkriptionsmuster von Ad12 Genen in produktiv infizierten menschlichen HeLa Zellen.
Gesamte RNA aus schein- oder Ad12-infizierten HeLa oder BHK21 Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion gereinigt und in Gegenwart von α-^{32}P-dCTP zu cDNA revers transkribiert. Die ^{32}P-markierte cDNA wurde an die Nylonmembran hybridisiert, welche M13-Ad12 ssDNA Arrays von 28 offenen Ad12 Leserastern enthielt und anschliessend auf einen Röntgenfilm exponiert wurde. Die Positionen der M13-Ad12 ssDNA Arrays sowie des β-Aktin Gens oder der M13 ssDNA sind im Feld für schein-infizierte Zellen eingetragen (oben links).

Schein-infizierte HeLa Zellen zeigten nur ein Signal für das β-Aktin Gen. Die Transkription früher Gene begann 6 bis 8 Stunden nach der Virusinfektion. Dabei wurden zunächst die E1A, E1B, E2A, E3 14.7 kDa, E3 14.5 kDa sowie E4 34 kDa Gene exprimiert (8 h p.i.). Bereits 14 h p.i. wurden alle analysierten frühen Gene aktiv transkribiert, und auch ein paar der späten Gene, darunter das Gen für das Fiberprotein, wurden aktiviert. Als die DNA Replikation in vollem Gange war, etwa 24 h p.i., wurden alle 28 analysierten Ad12 Gene exprimiert. Stark transkribiert wurden zu diesem Zeitpunkt E1B, E3 12.1 kDa sowie E3 14.7 kDa der frühen Gene, bei den späten Genen sind pV, hexonassoziertes Protein, 11 kDa, Endoprotease und pVIII hervorzuheben. Zum letzten untersuchten Zeitpunkt, 32 h p.i., änderte sich das Bild. Während die späten Gene alle stark transkribiert wurden, und da besonders pV, 11 kDa, Endoprotease und pVIII, wurden die frühen Gene langsam abgeschaltet. Virale Transkripte für Proteine der DNA Replikation (TP und AdPol) waren nicht mehr vorhanden, ebenso wie die meisten E4 Gene. Stark wurden jetzt noch E3 12.1 kDa, E3 14.7 kDa und E1B exprimiert. Die β-Aktin positive Kontrolle war ab dem Zeitpunkt 32 h p.i. nicht mehr sichtbar. Da in weiteren Kontrollen zum Zeitpunkt 32 h p.i. sowie auch zu späteren Zeiten keine β-Aktin Signale gefunden wurden (Daten nicht gezeigt), wurde dieses Gen vermutlich abgeschaltet.

Die Transkriptionsmuster Ad12-infizierter BHK21 Zellen waren sehr von denen in menschlichen Zellen unterschiedlich (Abb. 6b). Erst 14 h p.i. begann eine geringfügige Transkription von E1A und E2A. E1A und E2A wurden dann 24 h p.i. stärker exprimiert, auch E1B, drei der E3 Gene und zwei der E4 Gene zeigten schwache Signale, aber weder die für die Replikation wichtigen Transkripte des pTP oder der AdPol noch RNAs irgendwelcher späten Gene waren vorhanden. Nur noch in Spuren detektierbar waren 32 h p.i. die Transkripte der E1A-Region sowie des E3 14,7 kDa Gens, E2A wurde noch gut transkribiert.

Bereits die Transkriptionsmuster zeigten, dass nur ein Bruchteil der viral exprimierten Gene Ad12 infizierter HeLa Zellen in Ad12 infizierten BHK21 Zellen transkribiert wurde. Zudem wurde die Transkription wichtiger Gene für die DNA Replikation (AdPol und pTP) gar nicht detektiert, auch die späten Funktionen konnten zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Da aber in abortiv Ad12-infizierten BHK21 Zellen keine viralen DNA Replikation startete, fehlte auch die Transkription später Ad12 Gene, welche in produktiv Ad12-infizierten Zellen erst nach dem viralen DNA Replikationsstart auftraten.

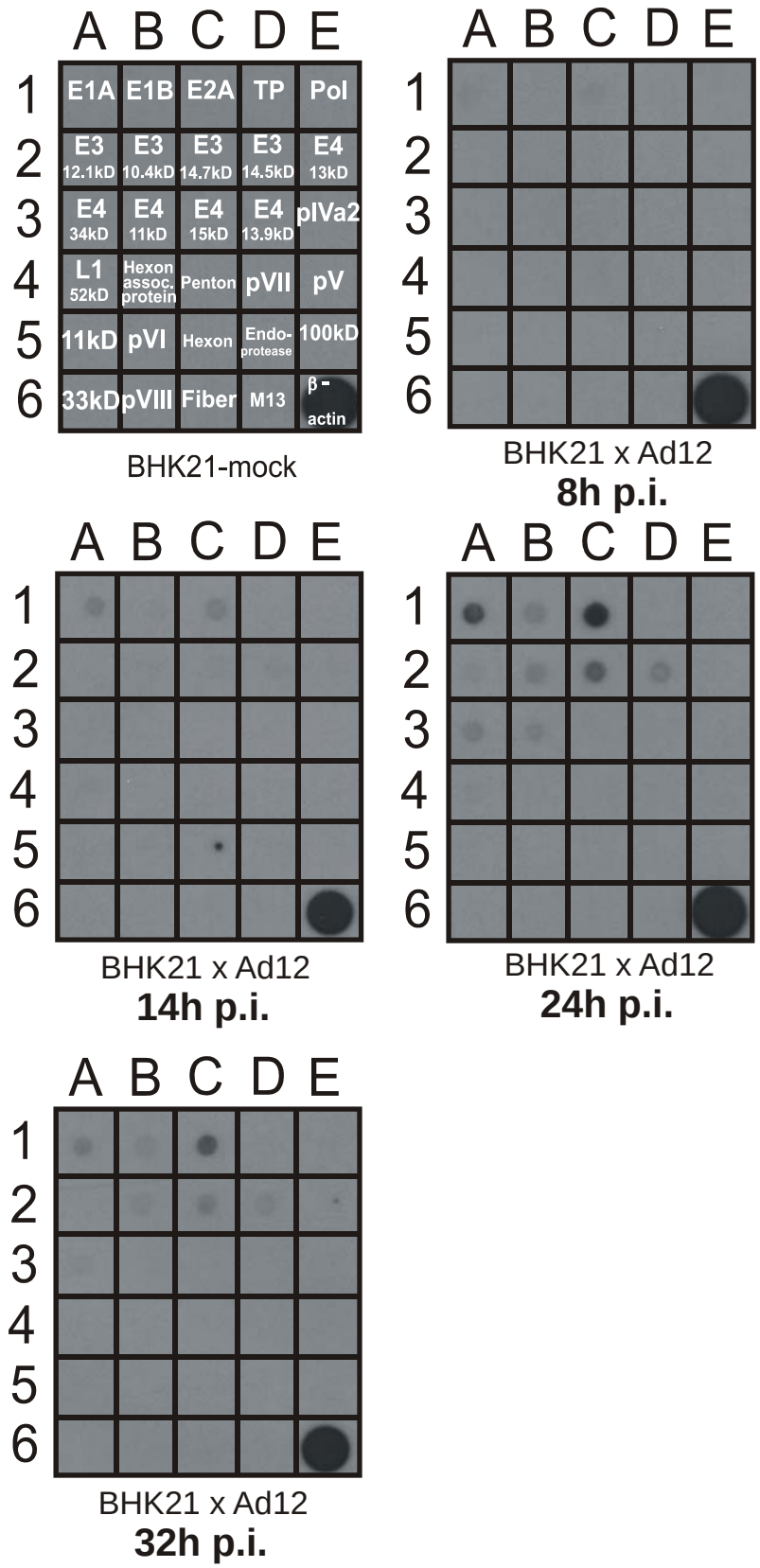


Abb. 6b
Transkriptionsmuster von Ad12 Genen in abortiv infizierten BHK21 Hamsterzellen.
Gesamte RNA aus schein- oder Ad12-infizierten HeLa oder BHK21 Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion gereinigt und in Gegenwart von α-^{32}P-dCTP zu cDNA revers transkribiert. Die ^{32}P-markierte cDNA wurde an die Nylonmembran hybridisiert, welche M13-Ad12 ssDNA Arrays von 28 offenen Ad12 Leserastern enthielt und anschliessend auf einen Röntgenfilm exponiert wurde. Die Positionen der M13-Ad12 ssDNA Arrays sowie des β-Aktin Gens oder der M13 ssDNA sind im Feld für schein-infizierte Zellen eingetragen (oben links).

3. Expression von E1A und pTP in Ad12 infizierten Zellen

Das präterminale Protein (pTP) ist bekannt in seiner Funktion als Proteinprimer für die adenovirale DNA Replikation und muss zwingend für eine Replikationsinitiation vorliegen. Das pTP Gen liegt gemeinsam mit der AdPol im Genabschnitt E2B und somit unter der Kontrolle des E2 Promotors. Wie alle frühen Promotoren wird auch E2 indirekt durch die E1A Funktionen aktiviert. Da pTP also ein essentieller Bestandteil für den Mechanismus der adenoviralen DNA Replikation ist, wurde die Expression des pTP und der E1A Gene als Aktivatoren der E2 Region in Ad12 infizierten Zellen untersucht. Westernblotanalysen verschiedener Ad12 infizierter Zellen zeigten die Expression der Ad12 E1A Proteine (Abb. 7a).

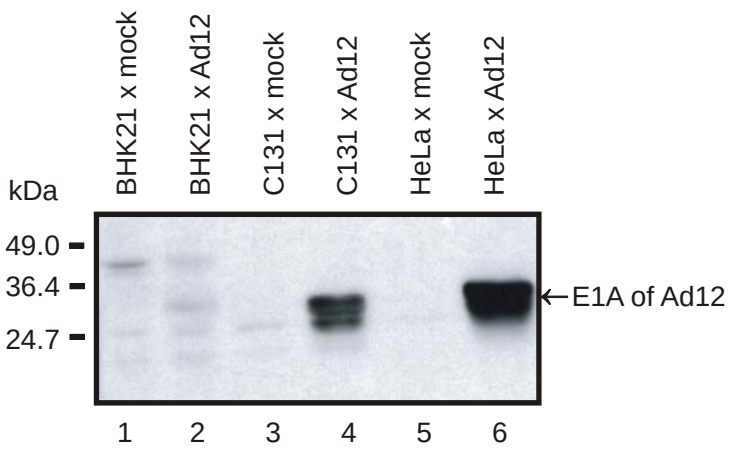


Abb. 7a
E1A Expression in Ad12-infizierten menschlichen Zellen oder Hamsterzellen. Proteinextrakte von schein-infizierten (Spur 1) oder Ad12-infizierten (Spur 2) BHK21 Zellen oder von schein-infizierten (Spur 3) oder Ad12-infizierten (Spur 4) C131 Zellen wurden 24 h p.i. präpariert. Proteinextrakte von schein-infizierten (Spur 5) oder Ad12-infizierten (Spur 6) HeLa Zellen wurden 16 h p.i. präpariert. 75 µg der Proteinextrakte wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und mittels Western Transfer Analyse auf die Präsenz des Ad12 E1A Proteins untersucht. Die Grössen der Markerproteine und die Positionen der Ad12 E1A Gene im Gel sind auf der rechten Seite angegeben.

Alle Zellen wurden 24 h nach der Infektion geerntet und 75 µg gesamtzelluläres Protein zur Western Transfer Analyse eingesetzt. Die schein-infizierten Kontrollen wiesen keine E1A Signale auf. In produktiv infizierten HeLa Zellen hingegen wurden grosse Mengen der E1A Produkte gefunden. Ad12 infizierte BHK297-C131 Zellen (im Folgenden nur noch C131 genannt) synthetisierten ebenfalls deutlich nachweisbare Mengen der Ad12 E1A Produkte. Vermutlich wurde die Expression der Ad12 E1A Produkte durch die Aktivierung des Ad12

E1A Promotors hervorgerufen. Ausschlaggebend für die Aktivierung werden die konstitutiv exprimierten E1A Funktionen des Ad5 gewesen sein, die stabil in C131 integriert sind. Die Ad5 E1A Proteine konnten mit dem anti-Ad12-E1A Antikörper nicht nachgewiesen werden (Abb. 7a - C131 schein-infizierte Kontrolle). In Ad12-infizierten BHK21 Zellen konnte nur ein schwaches E1A Signal detektiert werden. Die E1A Proteine wurden somit in BHK21 Zellen zwar translatiert, allerdings in sehr kleinen Mengen. Es ist fraglich, dass diese kleinen Mengen ausreichten, um andere Ad12 Promotoren effektiv anzuschalten.

Ganz ähnliche Resultate ergaben Western Transfer Analysen auf das 80 kDa grossen pTP Protein (Abb. 7b). Auch hier wird das meiste pTP in produktiv Ad12-infizierten HeLa Zellen produziert, etwas weniger ist in C131 Zellen detektierbar, und in Ad12-infizierten BHK21 Zellen konnte ein pTP Signal gefunden werden, dass knapp über der Nachweisgrenze liegt. In Ad12 Virionen liess sich nur das 55 kDa grosse TP nachweisen, denn pTP liegt als Proteinprimer nur während der DNA Replikation vor. Später wird das pTP durch die Ad12 Protease zum TP prozessiert, wie es hier bei Ad12-infizierten HeLa Zellen bereits sichtbar wurde (Abb. 7b, Spur 6).

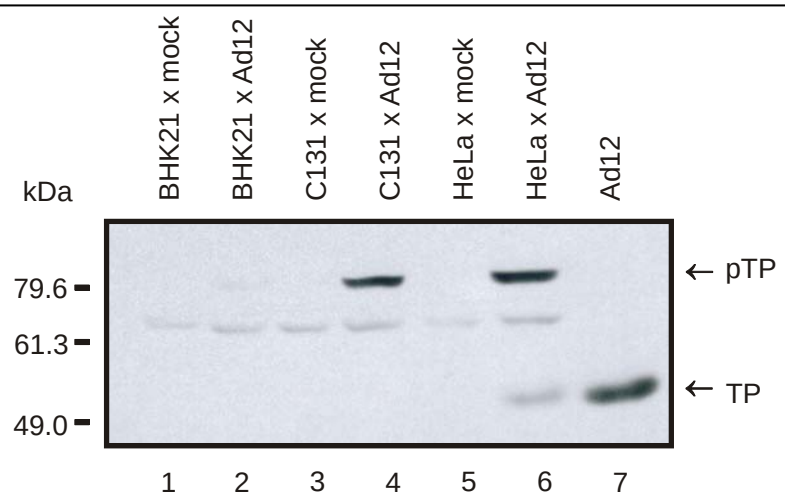


Abb. 7b
Synthese des pTP und TP in Ad12-infizierten BHK21, C131 oder HeLa Zellen.
Proteinextrakte von schein-infizierten (Spur 1) oder Ad12-infizierten (Spur 2) BHK21 Zellen oder von schein-infizierten (Spur 3) oder Ad12-infizierten (Spur 4) C131 Zellen wurden 28 h p.i. präpariert. Proteinextrakte von schein-infizierten (Spur 5) oder Ad12-infizierten (Spur 6) HeLa Zellen wurden 20 h p.i. präpariert. 100 µg der Proteinextrakte wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und mittels Western Transfer Analyse auf die Präsenz des Ad12-pTP oder Ad12-TP Proteins untersucht. Die Grössen der Markerproteine sind auf der linken Seite, die Positionen des Ad12-pTP und Ad12-TP im Gel sind auf der rechten Seite eingetragen. Ad12 Virionen ($2x10^8$ PFU) wurden zur Kontrolle und Identifikation des Ad12-TP ebenfalls durch Elekrophorese getrennt (Spur 7).

In Ad12 infizierten C131 und BHK21 Zellen konnte kein TP spezifisches Signal gefunden werden, vermutlich, weil die adenovirale Protease in diesen Systemen nicht exprimiert wird. In Ad12 infizierten BHK21 Zellen schien nicht genug E1A oder pTP produziert zu werden, um die Ad12 DNA Replikation zu starten, die in Ad12-infizierten und teilweise Ad5 komplementierten C131 Zellen oder in produktiv Ad12 infizierten HeLa Zellen möglich ist.

4. Transfektion des Ad12 E1A in BHK21 Zellen

Adenovirale E1 Funktionen sind Aktivatoren weiterer Adenopromotoren. Da diese E1 Gene in Ad12 infizierten BHK21 Zellen nur sehr schwach exprimiert wurden, lag es nahe, die E1A Gene durch Transfektion eines E1A-Vektorkonstruktes zunächst in den Hamsterzellen zu exprimieren, so dass bei einer nachfolgenden Ad12 Infektion genügend E1A Proteine vorhanden waren, welche effektiv weitere Adenoviruspromotoren aktivieren konnten. Dadurch könnten mehrere essentielle Proteine für die adenovirale DNA Replikation ausreichend produziert und DNA Synthese induziert werden. Western Transfer Analysen von Ad12 E1A transfizierten Zellen (Abb. 8a) zeigten eine starke Synthese des E1A Proteins (Spur 4). Nicht transfizierte und Ad12 infizierten BHK21 Zellen (Spur 2) oder naïve BHK21 Zellen, die mit dem Protein EGFP transfiziert und anschliessend mit Ad12 infiziert wurden, exprimierten wenig des Ad12 E1A Proteins. Die Ad12 Infektion E1A transfizierter BHK21 Zellen änderte die Menge an produziertem E1A Protein nicht. Erfolgreiche Transfektionen wurden durch Western Transfer Analysen des co-transfizierten GFP Proteins kontrolliert (Abb. 8, unten). Ähnliche Ergebnisse bot die Analyse der Ad12 pTP Expression in Ad12 E1A-transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen (Abb. 8b). Die Überexpression des Ad12 E1A Gens stimulierte die Synthese des pTP. Letzteres wurde als deutliches Signal sichtbar (Abb. 8b, Spur 5). Die Ad12 pTP Synthese in BHK21 Zellen wurde sogar noch effektiver durch Transfektion des Ad2 E1A Gens, bevor die Zellen mit Ad12 superinfiziert wurden (Abb. 8b, Spur 6). In keinem dieser Versuche wurde in BHK21 Zellen jedoch das pTP durch die adenovirale Protease zu TP prozessiert (Abb. 8b). Transfizierte E1A Gene der Adenovirus Typen 12 und 2 werden in ausreichender Menge exprimiert, so dass sie effektiv weitere Promotoren aktivieren können. Dadurch wird dann Ad12 pTP, der essentielle Proteinprimer für die adenovirale DNA Replikation, in erhöhten Konzentrationen synthetisiert.

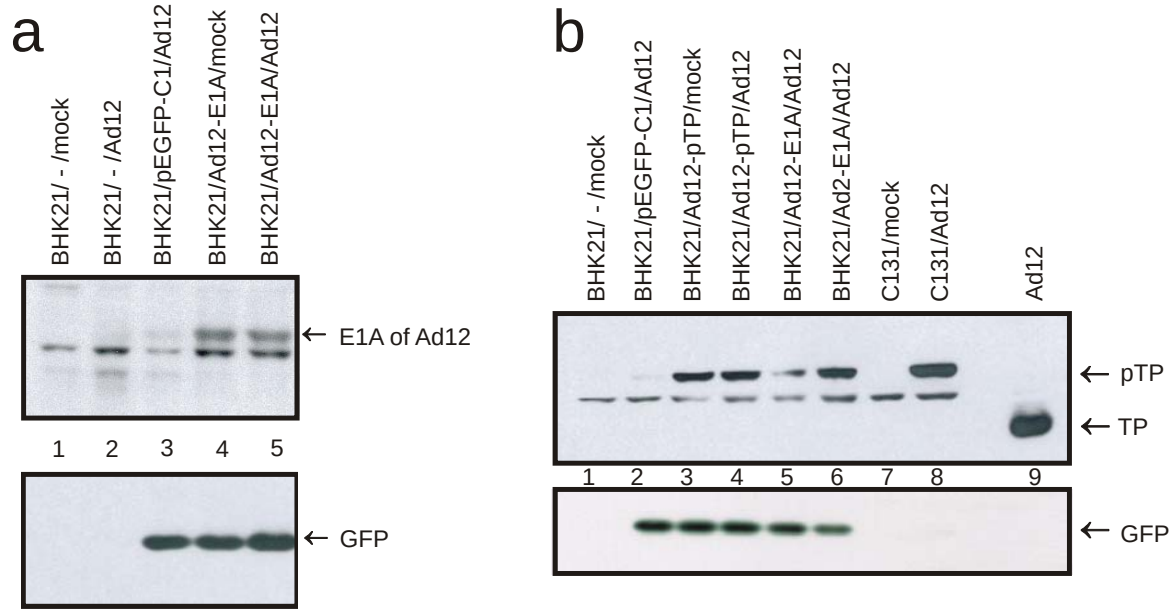


Abb. 8
Überexpression von Ad12 E1A oder Ad12 pTP in BHK21 Hamsterzellen.
BHK21 Zellen wurden mit Ad12 pTP-, Ad12 E1A- oder Ad2 E1A-Konstrukten durch Elektroporation transfiziert wie es im Material- und Methodenteil beschrieben wurde. Das pEGFP-C1 Plasmid wurde in allen Versuchen als eine interne Kontrolle co-transfiziert, um die Transfektions- und Expressionseffizienz verfolgen zu können. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Ad12 infiziert. 28 h p.i. wurden Proteinextrakte der Zellen erstellt. Je 100 µg der Proteine wurden in einem 12.5 %-igen SDS-Polyacrylamidgel durch Elektrophorese getrennt, und die Expression des Ad12 pTP oder E1A überprüft. (a) Analysen zum E1A Protein durch Western Transfer von Proteinen aus schein-transfizierten und schein-infizierten BHK21 Zellen (Spur 1), schein-transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen (Spur 2), sowie aus BHK21 Zellen transfiziert mit dem pEGFP-C1 Konstrukt und infiziert mit Ad12 (Spur 3), und BHK21 Zellen transfiziert mit dem Ad12 E1A Konstrukt und schein- (Spur 4) oder Ad12- (Spur 5) infiziert. (b) Analysen zum Ad12-pTP oder TP Proteins durch Western Transfer von Extrakten aus schein-transfizierten und schein-infizierten BHK21 Zellen (Spur 1), sowie von pEGFP-C1 transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen (Spur 2), von BHK21 Zellen transfiziert mit dem Ad12 pTP Konstrukt und schein- (Spur 3) oder Ad12-infiziert (Spur 4), von BHK21 Zellen transfiziert mit Ad12 E1A (Spur 5) oder Ad2 E1A (Spur 6) und infiziert mit Ad12, und von schein- (Spur 7) oder Ad12-infizierten (Spur 8) C131 Zellen. Gereinigte Ad12 Virionen ($4x10^8$ PFU) wurden zur Kontrolle und Identifizierung der Gelposition des Ad12 TP ebenfalls durch Elektrophorese getrennt (Spur 9). Zur Detektion des GFP auf der Membran wurde diese zunächst durch 30 minütiges Waschen bei 60 °C in einer Lösung, bestehend aus 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl [pH 6.7], von Ad12 E1A oder Ad12 pTP Antikörpern befreit (stripping). Anschliessend wurden die Membranen mit einem polyklonalen Antikörper gegen GFP inkubiert, um die Effizienz der Transfektion und die GFP Expression verfolgen zu können. Die Positionen von E1A von Ad12 (a), pTP und TP von Ad12 (b) und des GFP Proteins (a und b) sind auf der rechten Seite angegeben.

5. Ad12 virale DNA Replikation in BHK21 Zellen

Die oben beschriebenen Daten liessen die Frage offen, ob die Überexpression des Ad12 E1A Gens neben der Expression weiterer früher Ad12 Gene auch die Ad12 virale DNA Replikation in diesen Zellen initiieren konnte. Da die Produktion von pTP essentiell für die DNA Replikation war, in Ad12 infizierten BHK21 Zellen aber nur geringste Mengen des Proteinprimers synthetisiert wurden, wurde auch der Effekt einer Überexpression

ausschliesslich des pTP in den BHK21 Zellen untersucht. Die Hamsterzellen wurden mit dem pTP Gen transfiziert und wiesen starke pTP Expression auf (Abb 8b, Spur 3). Die Möglichkeit der viralen DNA Replikation wurde zunächst mittels Southern Transfer Analyse zu verschiedenen Zeiten nach der Transfektion und Infektion überprüft (Abb. 9). Dabei wurden BHK21 Zellen mit dem Gen für das GFP-Protein (a), Ad12 pTP (b), Ad12 E1A (c) oder Ad2 E1A (d) transfiziert. GFP transfizierte Zellen zeigten spezifische Signale des Ad12 *EcoRI*-E Fragmentes, welche auf das Vorliegen parentaler DNA hinwiesen, im weiteren Verlauf aber schwächer wurden. In allen anderen Tranfektionsversuchen war immer ein Anstieg der Signalstärke zwischen 14 und 20 h p.i. zu beobachten. Die grösste Menge an DNA war immer 28 h p.i. nachzuweisen. Zum Zeitpunkt von 36 h p.i. blieb die Signalstärke in Ad2-E1A transfizierten BHK21 Zellen konstant, während sie in Ad12-E1A und oder pTP transfizierten Zellen abnahm.

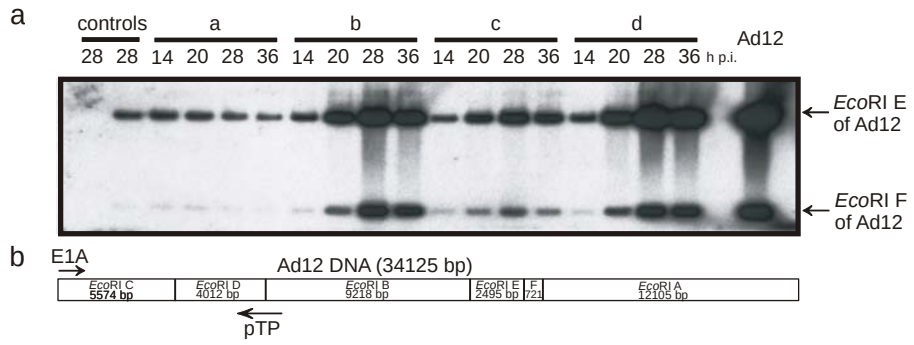


Abb. 9
DNA Analysen durch Southern Transfer von schein- oder Ad12-infizierten BHK21 Zellen (Kontrollen) oder von BHK21 Zellen transfiziert mit dem pEGFP (Spuren a), dem Ad12 pTP (Spuren b), dem Ad12 E1A (Spuren C), oder dem Ad2 E1A (Spuren d) Konstrukt und anschliessender Infektion mit Ad12 zum Zeitpunkt 18 h nach der Transfektion.
14, 20, 28 und 36 h p.i. wurde die gesamtzelluläre DNA extrahiert, und 10 µg der DNA wurden mit *EcoRI* geschnitten. Die Fragmente wurden in einem 0.8 %-igen Agarosegel durch Elektrophorese getrennt, auf eine Nylonmembran übertragen (Southern et al., 1975) und mit ^{32}P-markierten *EcoRI*-E und *EcoRI*-F Fragmenten der Ad12 DNA hybridisiert. DNA von schein- oder Ad12-infizierten BHK21 Zellen (Kontrollen) wurden 28 h p.i. aufbereitet. Gereinigte Ad12 Virionen DNA (0.5 ng) wurden mit *EcoRI* geschnitten und in der gleichen Elektrophorese analysiert. Die *EcoRI* Restriktionskarte der Ad12 DNA wurde zur Orientierung angefügt, die Positionen der E1A und pTP Gene von Ad12 wurden durch Pfeile markiert.

Die Daten liessen vermuten, dass transfizierte Ad12- oder Ad2-E1A Proteine in der Lage sein könnten, Ad12 DNA Replikation in BHK21 Zellen nach Ad12 Superinfektion zuzulassen. Interessant war die Tatsache, dass einzig und allein das transfizierte Ad12 pTP den viralen Ad12 DNA Replikationsblock überkommen zu können scheint.

6. *De novo* Synthese Ad12 viraler DNA in Ad12-E1A, Ad2-E1A oder Ad12 pTP transfizierten BHK21 Zellen

Southern Transfer Analysen Ad12-E1A-, Ad2-E1A- oder Ad12 pTP-transfizierter und Ad12 infizierter BHK21 Zellen deuten darauf hin, dass die Überexpression dieser Proteine zu einer Ad12 DNA Replikation in diesem sonst abortiven System führt (Abb. 9). Um sicher zu gehen, dass es sich bei der in diesem System neusynthetisierten DNA tatsächlich um Ad12 DNA handelte, wurde die neusynthetisierte DNA in transfizierten und Ad12-infizierten Zellen radioaktiv mit ^{3}H-Thymidin markiert und in alkalischen Sucrosedichtegradienten analysiert.

Schein-infizierte BHK21- HeLa- oder C131 Zellen wiesen nur einen Peak radioaktiv markierter DNA auf (Abb. D10 A, C und D), der auf eine Neusynthese zellulärer, genomischer DNA hinwies. Adenovirale DNA replizierte hier nicht. In EGFP transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen war ebenfalls keine Ad12 DNA Replikation zu beobachten (Abb. 10 B). In HeLa und C131 Zellen, welche permissiv für Ad12 virale DNA Replikation waren, führte Ad12 Infektion zu Ad12 DNA Synthese. Die neusynthetisierte DNA sedimentierte in den Fraktionen 17 oder 15 (Abb. 10 E und F). Wenn nichtpermissive BHK21 Zellen zuerst mit dem Ad12-pTP, Ad12-E1A oder Ad2 E1A transfiziert und anschliessend mit Ad12 infiziert wurden, konnte ein Peak von neusynthetisierter, ^{3}H-Thymidin markierter DNA jeweils in Fraktion 16 detektiert werden. Der geringe Einbau von ^{3}H-Thymidin in zelluläre DNA in den Abb. 10 E, G, H, und I war damit zu erklären, dass die Zellen während der Markierungsphase (6-28 h p.i.) nahe der Vollkonfluenz waren und somit die zelluläre DNA Synthese stark eingeschränkt war. Zum Nachweis, dass die radioaktiv markierte DNA in der Fraktion 16 tatsächlich Ad12 DNA war, wurden diese Fraktionen aller Experimente isoliert, neutralisiert und die DNA mittels Ethanolfällung konzentriert. Die Ad12 DNA wurde durch Southern Transfer Analyse und Hybridisierung mit einer ^{32}P-markierten Ad12 spezifischen Sonde identifiziert (Abb. 11). Starke Hybridisierungssignale wurden mit der DNA in Peakfraktionen gefunden und enthielt somit Ad12 DNA (Abb. 11, Spuren 1, 4, 7 und 10), die das gleiche Molekulargewicht aufwies wie aus Ad12 Virionen gereinigte DNA (Abb. 11, Spur 15). Die gleichen Gradientenfraktionen von Analysen der DNA von schein-infizierter HeLa oder BHK21 Zellen wiesen keine Ad12 DNA auf (Abb. 11, Spuren 2 und 13). Die DNA Fraktion 16 der nicht transfizierten BHK21 Zellen oder BHK21 Zellen die mit dem pEGFP-C1 Plasmid tranzfiziert worden waren, wiesen keinen Peak radioaktiv markierter DNA in den Sucrosedichtegradienten auf, enthielten aber trotzdem geringe Mengen viraler DNA, bei der es sich um parentale DNA handelte (Abb. 11, Spuren 12 und 14).

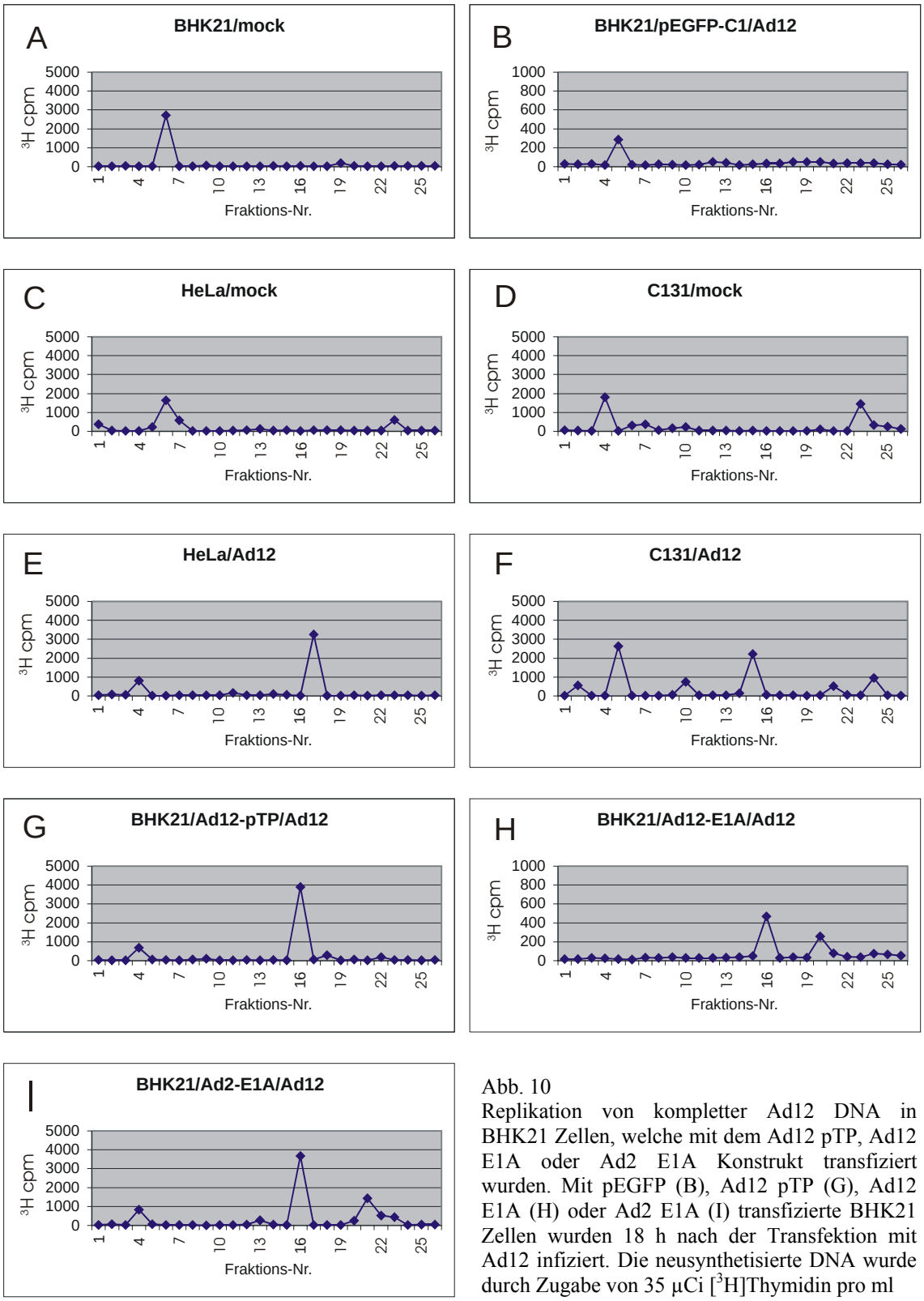


Abb. 10
Replikation von kompletter Ad12 DNA in BHK21 Zellen, welche mit dem Ad12 pTP, Ad12 E1A oder Ad2 E1A Konstrukt transfiziert wurden. Mit pEGFP (B), Ad12 pTP (G), Ad12 E1A (H) oder Ad2 E1A (I) transfizierte BHK21 Zellen wurden 18 h nach der Transfektion mit Ad12 infiziert. Die neusynthetisierte DNA wurde durch Zugabe von 35 µCi [^{3}H]Thymidin pro ml Medium nach 6 h p.i. markiert. Die gesamte DNA wurde 28 h p.i. der Grösse nach im alkalischen Sucrose-Dichtegradienten aufgetrennt und einzelne Fraktionen auf Radioaktivität untersucht (Material und Methoden). DNA von schein-transfizierten und schein-infizierten BHK21 Zellen (A), von schein-infizierten (D) oder Ad12-infizierten (F) C131 Zellen, oder von schein-infizierten (C) oder Ad12-infizierten HeLa Zellen (E) wurde 28 h p.i. aufbereitet und nach dem gleichen Protokoll analysiert

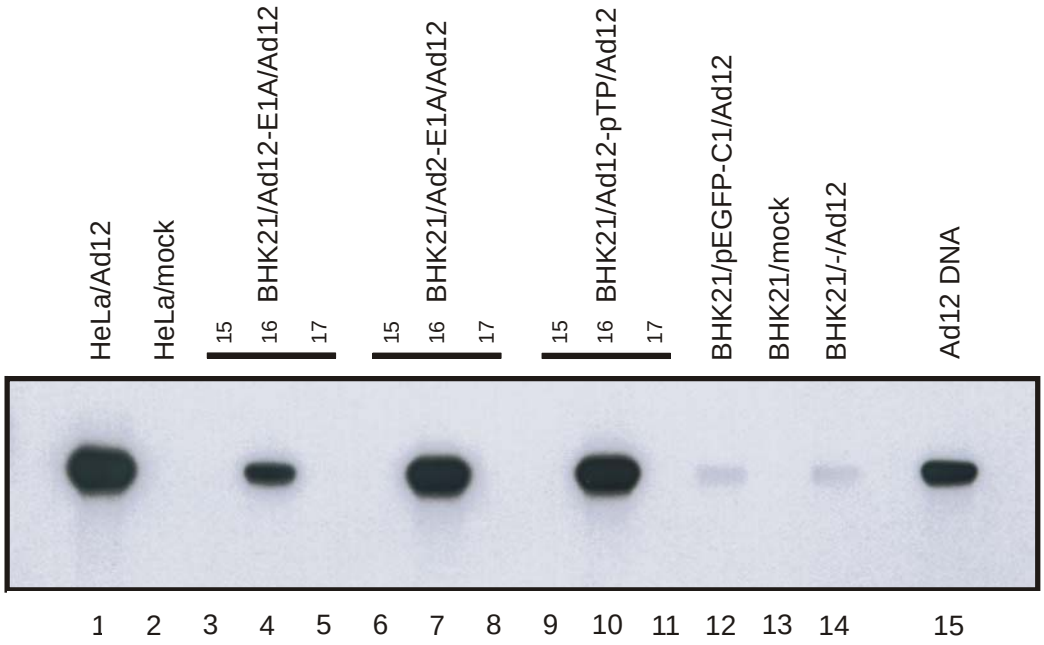


Abb. 11
Identifikation von Ad12 DNA in den Peakfraktionen.
^{3}H-markierte Peakfraktionen der alkalischen Sucrose-Dichtegradienten aus Abb. D6 mit neusynthetisierter DNA aus Ad12-infizierten HeLa Zellen (Spur 1) oder aus Ad12-infizierten BHK21 Zellen die zuvor mit Ad12 E1A (Spur 4), Ad2 E1A (Spur 7) oder Ad12 pTP (Spur 10) Konstrukten transfiziert worden waren, wurden mit Essigsäure neutralisiert, ethanolpräzipitiert, durch Elektrophorese im 0.7 %-igen Agarosegel analysiert und anschliessend auf eine Nylonmembran transferiert (Southern et al., 1975). Hybridisiert wurde mit ^{32}P-markierte Ad12 DNA. Vergleichbare Fraktionen schein-infizierter HeLa (Spur 2) oder BHK21 Zellen (Spur 13) wurden ebenfalls durch Elektrophorese getrennt. Gereinigte Ad12 DNA wurde zur Identifizierung authentischer Ad12 DNA ebenfalls aufgetrennt (Spur 15). Benachbarte Fraktionen zur jeweiligen Fraktion 16 der Gradienten (Spuren 3 und 5 - 6 und 8 - 9 und 11) wurden co-elektrophoretisiert, zeigten aber keine Ad12-spezifischen Signale.

Durch die Oben gezeigten Daten kommt die Frage auf, ob das überexprimierte Ad12 pTP in den BHK21 Zellen tatsächlich als Primer für die die Ad12 DNA Replikation dient und ob es an neusynthetisierte Ad12 DNA gebunden bleibt. BHK21 Zellen wurden dazu mit einem der Expressionskonstrukte transfiziert und anschliessend mit Ad12 infiziert. Ad12-infizierte HeLa oder Ad12-infizierte komplementierende C131 Zellen wurden als Kontrollen gewählt. Nach der Inkubation der Zellysate mit dem Ad12 pTP Antiserum und der Protein-A-Agarose, wurden die Immunopräzipitate mit Proteinase K behandelt, um die Ad12 DNA von den Ad12 DNA-pTP/Ad12 pTP-Antiserum-Protein-A-Agarose Komplexen zu lösen. Die Überstände wurden durch Southern Dot Blot Analyse auf die Präsenz von Ad12 DNA, mittels einer ^{32}P-markierten Ad12 DNA Sonde, untersucht. Grosse Mengen von Ad12 DNA konnten durch diese Methode von Ad12-infizierten HeLa oder C131 Zellen immunopräzipitiert werden (Abb. 12 B4 oder B2). Wurde kein pTP Antiserum zu den Ad12-infizierten HeLa Extrakten gegeben, konnten keine Ad12 DNA spezifischen Signale nachgewiesen werden (Abb. 12 B5). Ad12 DNA konnte ebenfalls von nicht permissiven BHK21 Zellen präzipitiert werden,

welche zuvor mit Ad12 E1A, Ad2 E1A, oder Ad12 pTP transfiziert und anschliessend mit Ad12 infiziert worden waren (Abb. 12 A4, A5 und A6).

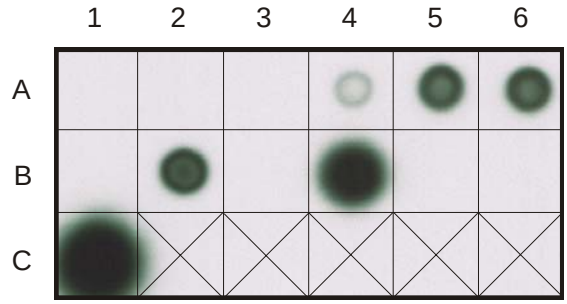


Abb. 12
Immunopräzipitation von Ad12 DNA mittels eines anti-Ad12 pTP Serums.
Proteinextracte von mock-infizierten BHK21 (A1), C131 (B1), oder Hela (B3) Zellen, von Ad12-infizerten BHK21 (A2), C131 (B2) oder HeLa (B4) Zellen oder von Ad12-infizierten BHK21 Zellen, welche zuvor mit dem pEGFP-C1 (A3), Ad12 E1A (A4), Ad2 E1A (A5), oder Ad12 pTP (A6) Konstrukt trasfiziert worden waren, wurden mit Kaninchen anti-Ad12 pTP polyclonalen Antikörpern immunopräzipitiert, wie es im Material- und Methodenteil beschrieben wurde. Proteinextrakte von Ad12-infizierten HeLa Zellen, welche mit dem Protein-A-Agarose Konjugat, aber ohne Zusatz des Ad12 pTP-Antiserums inkubiert wurden (B5) oder Proteinextrakte von Ad12 pTP-transfizierten und schein-infizierten BHK21 Zellen (B6) waren negative Kontrollen. Nach einer Proteinase K Behandlung wurden die Überstände durch Southern Dot Blot Hybridisierung analysiert. ^{32}P-markierte Ad12 DNA diente als Hybridisierungssonde. Gereinigte

Die Mengen immunopräzipitierter Ad12 DNA von Ad12 pTP oder Ad2 E1A transfizierten BHK21 Zellen (Abb. 12 A6 und A5) waren vergleichbar mit den nachgewiesenen Mengen Ad12-infizierter C131 Zellen (Abb. 12 B2). Merklich weniger Ad12 DNA wurde von Ad12 E1A transfizierten BHK21 Zellen immunopräzipitiert (Abb. 12 A4). Diese Daten bestätigen die Resultate der *de novo* Synthese von Ad12 DNA in transfizierten BHK21 Zellen wie sie für die Sucrosedichtegradienten und die Southern Transfer Analyse gezeigt wurden (Abb. 9 bis 11). Ad12 pTP- und Ad2 E1A-, sowie in geringerem Maße Ad12 E1A-transfizierte und Ad12-infizierte BHK21 Zellen, konnten *de novo* Synthese von Ad12 DNA durchführen. In schein-infizierten BHK21 Zellen wurde keine Ad12 DNA nachgewiesen (Abb. 12 A1, B1 und B3).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression des Ad12 pTP Gens oder des E1A Gens von Ad12 oder Ad2 zur Synthese adenoviraler DNA führt, wobei nicht nur die Replikations initiiert wird, sondern komplette Genome synthetisiert werden. Die Replikation von Ad12 DNA in nur Ad12 infizierten und nicht vorbehandelten BHK21 Zellen bleibt blockiert, vermutlich, weil die Produktion essentieller früher Gene zu gering ist. Hingegen löst die Überexpression des Ad12 pTP Gens alleine Ad12 virale DNA Replikation aus (Abb. 10 G), und die Überexpression des Ad2-E1A Proteins scheint die Ad12 DNA Replikation in BHK21 Zellen effektiver als das Ad12-E1A Protein stimulieren zu können (Abb. 9 und 10 H-I).

7. Expression später viraler Gene

Der Block der Ad12 DNA Replikation in Ad12 infizierten Zellen konnte durch Transfektion essentieller früher Funktionen überkommen werden. Auch bisher konnte zwar in komplementierenden Systemen, wie z.B. bei der Ad12 Infektion von C131 Zellen oder der Co-Infektion von Ad12 und Ad2 in BHK21 Zellen, DNA-Synthese beobachtet werden, jedoch blieb die Translation aller späten viralen Proteine aus. Sei es, weil entweder die Translation vorhandener später mRNAs blockiert wurde (Ad12 Infektion in C131 Zellen) oder weil späte Gene erst gar nicht vom Major Late Promotor (MLP) transkribiert wurden (Ad12 Infektion in BHK21 Zellen).

Proteinextrakte der Ad12-pTP-, Ad12-E1A- oder Ad2 E1A-transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen wurden ebenfalls auf die Synthese des späten Fiberproteins untersucht. Mittels Western Transfer Analyse der 30 h p.i. geernteten Zellen (Abb. 13) konnte eine Ad12 Fiberproteinsynthese nur in produktiv Ad12-infizierten HeLa Zellen nachgewiesen werden. Alle nur Ad12-infizierten sowie die mit Genkonstrukten transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen blieben ohne Fiber spezifische Signale. Diese Daten korrelieren mit Ergebnissen von RT-PCR Versuchen, in welchen sich kein Unterschied in der Transkription später Gene von Ad12-pTP-, Ad12-E1A- oder Ad2 E1A-transfizierten und Ad12 infizierten

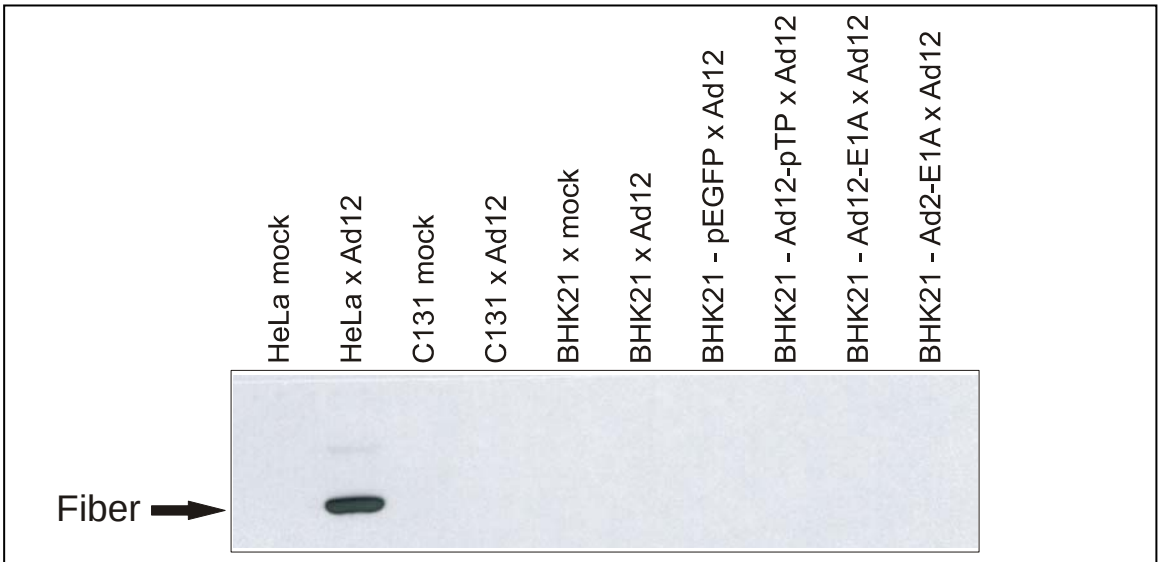


Abb. 13
Translation des späten Fiberproteins in menschlichen Zellen und in Hamsterzellen.
Proteinextrakte schein- oder Ad12-infizierter HeLa, C131 oder BHK21 Zellen, sowie pEGFP, Ad12 pTP, Ad12 E1A oder Ad2 E1A transfizierter und anschliessend Ad12-infizierter BHK21 Zellen wurden 28 h p.i. präpariert. Jeweils 100 µg wurden zur Analyse mit Western Transfer in einem 12.5 %igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf die Präsenz von Ad12 Fiberproteinen untersucht. Die Position des authentischen Fiberproteins im Gel ist auf der linken Seite angezeigt.

BHK21 Zellen im Vergleich zu nur Ad12 infizierten BHK21 Zellen zeigten (Daten nicht gezeigt, Hösel et al., 2001).

Obwohl der Ad12 DNA-Replikationsblock in BHK21 Zellen überkommen wurde, wurden nicht alle Hürden in diesem abortiven System genommen. Mit der Überexpression früher viraler Funktionen, wie die der Ad12- oder Ad2-E1A Gene, welche unter anderem die Expression des Ad12-pTP Gens stark aktivieren, kann die virale DNA Replikation initiiert werden. Interessanterweise konnte auch ausschliesslich durch die Überexpression des adenoviralen Proteinprimers (pTP) Ad12 DNA Replikation in BHK21 Zellen erreicht werden. Eine DNA-Replikation ohne vorhandenen pTP Primer, wie bei der naïven Ad12 Infektion von BHK21 Zellen, wäre auch nicht möglich.

8. Ad12 Adsorption an und Penetration in humane HeLa und BHK21 Hamsterzellen

Die Expression früher viraler Ad12 Funktionen in BHK21 Zellen verläuft auf sehr niedrigem Niveau. Essentielle Proteine zur DNA Replikation werden zwar produziert, jedoch reichen die Mengen nicht aus, um Ad12 virale DNA-Synthese zu starten. Vielleicht liegt diese Tatsache aber nicht oder nicht nur im niedrigen Transkriptionsniveau begründet, sondern hat ihren Ursprung schon viel früher in der Infektion.

Der erste Schritt einer Virusinfektion beginnt immer mit der Adsorption an und Penetration in die Wirtszelle. Diese Schritte werden im Adenovirussystem durch den Coxackievirus und

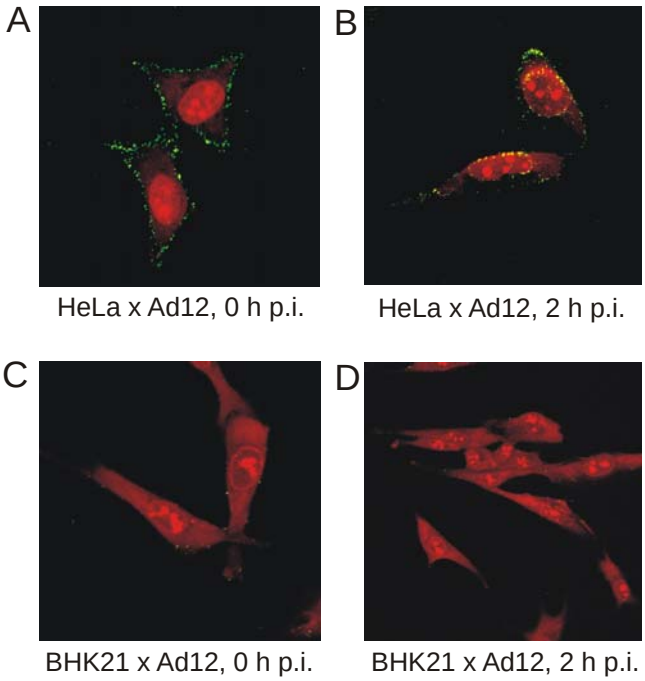


Abb. 14
Adsorption von Ad12 an HeLa und BHK21 Zellen.
Ad12 Virionen wurden bei 4°C an menschliche HeLa (A und B) oder BHK21 Hamster (C und D) Zellen adsorbiert. Die Zellen wurden entweder 30 min nach der Inkubation mit Ad12 bei 4°C (A und C), oder erst nach einem Temperatursprung für 2 h auf 37°C (B und D) fixiert. Ad12 Virionen wurden durch Immunofluores-zenzfärbung mit einem polyklonalen Kaninchenantiserum gegen das Ad12 virale Protein XI detektiert.

Adenovirus Rezeptor (CAR) vermittelt. Somit stellt sich die Frage, ob bereits in dieser frühesten Infektionsphase Unterschiede zwischen der Ad12 Infektion in permissiven HeLa und nicht permissiven BHK21 Zellen auftreten.

Immunofluoreszenzanalysen Ad12 infizierter HeLa oder BHK21 Zellen zeigten, dass eine grosse Anzahl Ad12 Partikel (grün) sofort nach der Inokulation an die Cytoplasmamembran von HeLa Zellen adsorbierte (Abb. 14 A). Zwei Stunden nach der Inokulation waren bereits grosse Mengen der Ad12 Virionen in die Zelle eingedrungen und im Cytoplasma oder rund um den Zellkern (rot) nachzuweisen (Abb. 14 B). BHK21 Zellen, die mit der gleichen Anzahl Ad12 Virionen unter gleichen Bedingungen inokuliert wurden wie HeLa Zellen, wiesen nur sehr wenige und vereinzelte Ad12 spezifische Signale an der Zellmembran auf (Abb. 14 C). Nach einer 2 stündigen Inkubationszeit bei 37°C änderte sich das Bild nicht. Nur vereinzelt liessen sich Viruspartikel an der Zellmembran nachweisen, keine Virionen waren im Cytoplasma oder gar am Zellkern der BHK21 Zellen zu finden.

Die Immunfluoreszenzversuche zeigten eine effektive Penetration von Ad12 Partikeln in menschlichen HeLa Zellen. Für BHK21 Zellen war bekannt, dass Ad12 DNA in den Zellkern der Hamsterzellen eingeschleust wurden, obwohl durch Immunfluoreszenz keine Virionen in diesen Zellen gefunden wurden. Die Detektion von Ad12 durch Immunofluoreszenzanalysen schien für BHK21 Zellen nicht ausreichend sensitiv zu sein.

9. Viraler DNA Import in den Nukleus von produktiv und abortiv infizierten Zellen

Das Auffinden einer grossen Anzahl von Ad12 Virionen am Nukleus Ad12 infizierter HeLa Zellen bedeutet nicht, dass alle transportierte DNA tatsächlich in den Kern importiert wird. Auch die Abwesenheit von Ad12 in immunofluoreszenzgefärbten BHK21 Zellen schliesst nicht aus, dass nicht doch einige wenige DNA Genome bis in den Zellkern dieser Zellen gelangen. Zur Analyse importierter viraler DNA in den Zellkern von HeLa oder BHK21 Zellen wurde die nukleäre DNA 4 h nach der Ad12 Infektion dieser Zellen isoliert und mittels quantitativer LightCycler PCR auf virale Genome untersucht. Zum Vergleich wurden beide Zellinien unter gleichen Bedingungen parallel mit Ad2 infiziert.

Grosse Mengen viraler DNA wurden in allen produktiv infizierten Zellkernen gefunden. Ad2 sowie Ad12 DNA wurde in vergleichbaren Mengen in die Kerne der menschlichen Zellen transportiert (Abb. 15 A). Der Import von Ad2 DNA in den Kern von Hamsterzellen in diesem Experiment schien weniger effizient zu sein, was aber durch versuchsbezogene

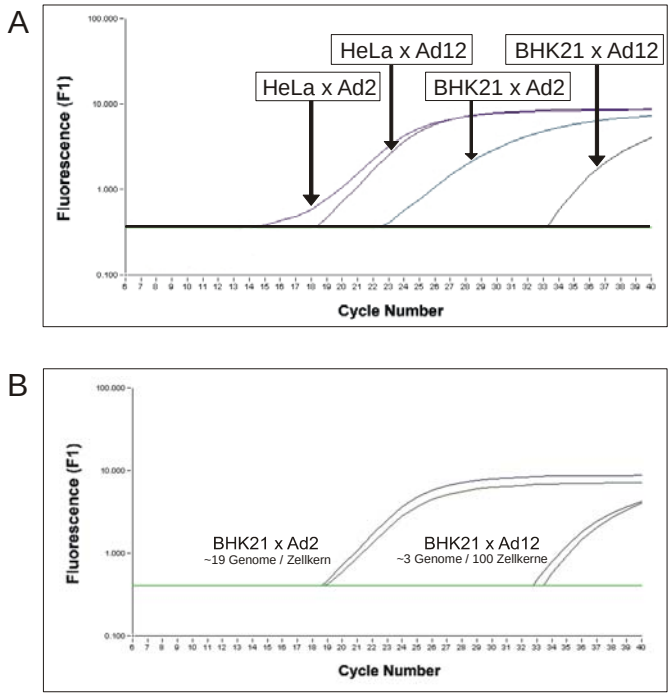


Abb. 15
Quantitative Analyse des Imports von Adenovirus DNA in die Kerne von permissiven und nicht permissiven Zellen.
(a) BHK21 oder HeLa Zellen wurden entweder mit Ad12 oder Ad2 für eine Dauer von 4 Stunden infiziert. Anschliessend wurde die nukleäre DNA präpariert, und 100 ng wurden zur quantitativen LightCycler Methode (Roche) mit Sybr Green verwendet. Die Kurven signalisieren zunehmende Mengen der viralen DNA in den Zellkernen. Je geringer die Anzahl der Zyklen ist, bei der die Kurve erscheint, umso grösser ist die DNA Menge. (b) BHK21 Zellen wurden entweder mit etwa 30 PFU Ad2 oder Ad12 in je zwei unabhängigen Experimenten für 4 h infiziert. Anschliessend wurde die nukleäre DNA isoliert und 100 ng wurden zur quantitativen LightCycler Methode (Roche) mit Sybr Green verwendet. Unter Berücksichtigung von definierten Standards, der Anzahl an PFUs und der analysierten Anzahl von Zellen, lassen sich die gefunden Genomäquivalente der produktiven Infektion von Ad2-infizierten BHK21 Zellen auf 20 virale Genome pro Kern und für das abortive System von Ad12-infizierten BHK21 Zellen auf etwa 0.3 virale Genome pro Zellkern beziffern.

Schwankungen erklärbar sein könnte. Vergleichbare weitere Experimente zeigten effektiveren Transport von Ad2 DNA in Kerne von Hamsterzellen. Allerdings wurde immer wesentlich weniger Ad12 DNA in den Kernen von Hamsterzellen gefunden. Berücksichtigte man dieAnzahl infizierter Zellen, die Anzahl inokulierter Viruspartikel und die parallel in der PCR laufenden, definierten Mengenstandards adenoviraler DNA, liess sich die ungefähre Zahl viraler Genome in den Zellkernen berechnen. In Ad12-infizierten BHK21 Zellen erreichte maximal 600-fach weniger virale DNA den Zellkern, als im vergleichbaren produktiven System (Abb. 15 B).

Die Berechnung der Ergebnisse in Abb. 15 B lautete wie folgt:

Die DNA eines doppelsträngigen Ad12 Genoms mit 34.125 Basenpaaren wiegt etwa 35.7 Attogramm (ag). Die absolute Menge gefundener Ad12 DNA im Bezug auf Ad12 Standard PCR Läufe (Daten nicht gezeigt) belief sich im abortiven System auf etwa 0.035 pg pro

$3.3x10^4$ Zellen. Demnach kommen auf $3.3x10^4$ Zellen etwa 980 Adenogenome. Dieses entspricht etwa 3 Ad12 Genomen pro 100 BHK21 Zellkernen. Die DNA eines doppelsträngigen Ad2 Genoms mit 35.937 Basenpaaren wiegt etwa 39.4 ag. Die absolute Menge gefundener Ad2 DNA im Bezug auf Ad2 Standard PCR Läufe (Daten nicht gezeigt) belief sich im produktiven System auf etwa 33 pg pro $4.5x10^4$ Zellen. Demnach kommen auf $4.5x10^4$ Zellen etwa $8.44x10^5$ Adenogenome. Dieses entspricht etwa 19 Ad2 Genomen pro BHK21 Zellkern.

Die in Abb. 15 A und B gemachten Beobachtungen stimmen mit den Immunofluoreszenz-versuchen überein, dass wesentlich weniger Ad12 Virionen an BHK21 Zellen adsorbieren und ins Cytoplasma penetrieren können.

10. Analyse intranukleärer viraler DNA in Ad2- oder Ad12-infizierten HeLa oder BHK21 Zellen während der ersten 24 h p.i.

Nur sehr geringe Mengen Ad12 DNA wurden 4 h p.i. in die Kerne von BHK21 Hamsterzellen transportiert. In den produktiven Systemen wurden zu diesem Zeitpunkt quantitativ wesentlich mehr Adenovirusgenome gefunden. Der zeitliche Ablauf und der Vergleich zwischen den Adenivirus infizierten Zellen während der ersten 24 h der Infektion (Abb. 16) zeigte, dass die Menge von Ad12 DNA in BHK21 Zellen immer weit unterhalb der Werte produktiv Adenovirus infizierter Zellen lag.

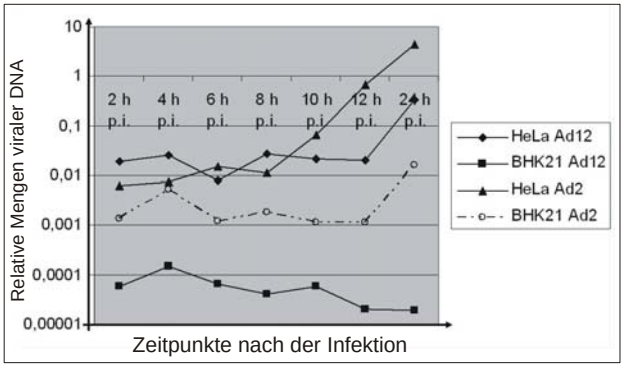


Abb. 16
Quantifizierung von Ad2 oder Ad12 DNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion.
Zellen wurden mit entweder Ad2 oder Ad12 für Zeitperioden zwischen 2h und 24 h infiziert. Nukleäre DNA wurde isoliert, und 100 ng wurden zur quantitativen LightCycler Methode (Roche) mit Sybr Green verwendet. Jede Kurve repräsentiert die relativen Mengen viraler Genome, welche in Ad12 oder Ad2 infizierten HeLa oder BHK21 Zellen gefunden wurden. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass die gefundene Menge viraler DNA in Ad 12-infizierten BHK21 Zellen im Vergleich zu den produktiven Systemen stets etwa 100-fach geringer war.

Bis zum Zeitpunkt 24 h. p.i. nahm die Anzahl der Ad12 DNA in Hamsterzellen sogar ab. Parentale Ad12 DNA wurde also degradiert. Produktiv infizierte Zellen wiesen zu jedem Zeitpunkt mindestens 100-fach mehr virale DNA in den Zellkernen auf, als im nicht-permissiven BHK21 System gefunden wurde (Abb. 16). Die Menge viraler DNA in den produktiv infizierten Zellen blieb nach dem Import, etwa 2 h p.i., relativ konstant, bis nach etwa 8 Stunden in Ad2 infizierten HeLa Zellen die virale DNA Replikation begann, was am starken Anstieg der Menge viraler DNA sichtbar war (Abb. 16, HeLa x Ad2). Zwischen 12 h und 24 h p.i. begann auch in Ad12 infizierten HeLa oder Ad2 infizierten BHK21 Zellen die virale DNA Replikation (Abb. 16).

Es zeigte sich, dass sehr wenig Ad12 DNA in die Kerne von BHK21 Zellen gelangte. Die Möglichkeit, dass der Ad12 DNA Import grösserer Mengen im abortiven System mehr Zeit benötigte, und ein Maximum erst nach 6 h oder mehr Stunden p.i. erreicht würde, bestätigte sich nicht. Der Ad12 DNA Import aller Adenovirus infizierten Systeme war nach 2 bis 4 Stunden abgeschlossen. Von diesem Zeitpunkt an verringerte sich die Menge Ad12 viraler DNA in BHK21 Hamsterzellen sogar (Abb. 16 unten, BHK21 x Ad12).

11. CAR Expression in menschlichen und Hamsterzellen

Adenoviren benötigen in der Regel den CAR Rezeptor für eine effektive Adsorption an und Penetration in ihre Wirtszellen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob in BHK21 Zellen CAR exprimiert wird, und wenn ja, in welchen Mengen der Rezeptor vorliegt. Die CAR Expression in HeLa und BHK21 Zellen wurde durch Western Transfer Analyse verglichen. Der CAR Rezeptor besitzt eine M_R von etwa 46 kDa und ist in schein- sowie auch in Ad12-infizierten HeLa Zellen nachweisbar gewesen (Abb. 17). Stärker wurde der CAR Rezeptor in BHK21 Zellen exprimiert (Abb. 17), und war unabhängig von der Infektion durch Ad12. Gereinigte Ad12 Virionen zeigten keine CAR spezifischen Signale.

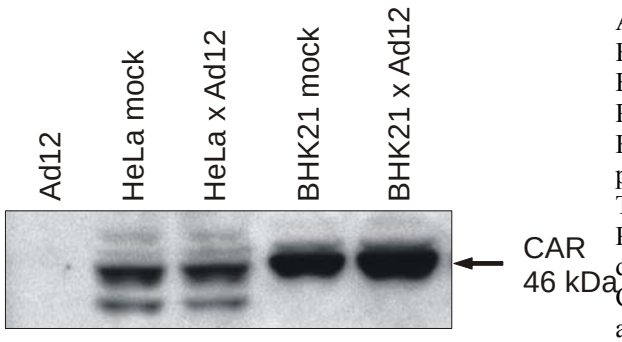


Abb. 17
Expression des CAR Rezeptors in HeLa und BHK21 Zellen.
Proteinextrakte schein- oder Ad12-infizierter HeLa oder BHK21 Zellen wurden 24 h p.i. präpariert. Jeweils 30 µg wurden zur Western Transfer Analyse in einem 12.5 %-igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf die Präsenz des CAR Rezeptors untersucht. Die Position des CAR-Proteins im Gel ist auf der rechten Seite angegeben. Gereinigte Ad12 Virionen ($3x10^8$) wurden zur Kontrolle co-elektrophoretisiert.

Die Western Transfer Experimente zeigten, dass CAR in BHK21 Zellen in grossen Mengen produziert wurden. Ad12 schien trotz des präsenten Hamster-CAR jedoch nicht BHK21 Zellen binden zu können, vermutlich weil die Bindestellen zwischen dem Ad12 Knob-Protein und dem Hamster-CAR inkompatibel waren. Mit der Methode des Western Transfers kann auch nicht entschieden werden, ob das CAR Protein in Hamsterzellen in einer Konformation vorliegt, die mit Ad12 interagieren kann.

12. Transfektion des menschlichen CAR in BHK21 Zellen

Ad12 kann nicht effektiv an BHK21 Zellen binden, sei es, weil das Ad12-Knob Protein nicht an den Hamster-CAR binden kann, oder weil andere physikalische Barrieren den Hamster-CAR nicht zugänglich machen. Andererseits können Ad2 und Ad5 BHK21 effektiv und produktiv infizieren. Aus der letztlich sehr schlechten Internalisierung von Ad12 in BHK21 Zellen resultiert eine sehr geringe Anzahl von Ad12 Genomen in den Hamsterzellkernen. Zu wenige frühe Genprodukte werden von zu geringen Anzahlvon Ad12 DNA Matrizen synthetisiert, so dass die Ad12 DNA nicht repliziert wird.
Die Expression des menschlichen CAR Rezeptors (hCAR) in BHK21 Zellen sollte Ad12 die Möglichkeit geben, nach Adsorption an und Penetration in die Hamsterzellen, eine grosse Anzahl Ad12 Genome in den Zellkern einzubringen und als Folge virale DNA-Synthese zu ermöglichen. Deshalb wurde das hCAR Gen in einen Expressionsvektor unter die Kontrolle des HCMV-Promotors kloniert. Kontrollen zur Expression des hCAR in schein- oder Ad12 infizierten HeLa Zellen, schein- oder Ad12-infizierten BHK21 Zellen, sowie mit dem hCAR Gen oder mit dem Kontrollvektor transfizierten BHK21 Zellen durch die quantitative LightCycler Methode zeigte, dass das menschliche CAR Protein nur in HeLa und in den hCAR transfizierten Zellen transkribiert wurde. In hCAR transfizierten Zellen war die Transkription sogar stärker als in HeLa Zellen (Abb. 18). Unter den in diesen Experimenten gewählten Bedingungen und mit den hCAR spezifischen Primern wurde die Hamster-CAR Sequenz nicht erkannt. Somit gab es keine Interferenz mit dem Nachweis von hCAR Aktivitäten in menschlichen Zellen.

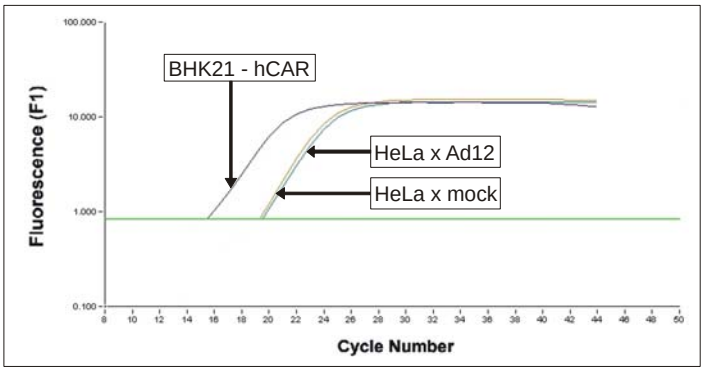


Abb. 18
Quantifizierung hCAR spezifischer Transkripte in HeLa und hCAR-transfizierten BHK21 Zellen.
Gesamtzelluläre RNA aus schein- oder Ad12-infizierten HeLa Zellen wurde 24 h p.i. und aus hCAR-transfizierten BHK21 Zellen 24 h nach der Transfektion extrahiert. Nach reverser Transkription von 500 ng RNA wurde jeweils 1/10 der synthetisierten cDNA zur quantitativen LightCycler Analyse (Roche) mit Sybr Green und hCAR spezifischen Primern verwendet. Je geringer die Anzahl der Zyklen ist, bei der die Kurve in die exponentielle Phase geht, desto grösser war die Anzahl von Ad12 DNA Molekülen in den Zellkernen.

Quantitative PCR Analysen hCAR-transfizierter und Ad12-infizierter BHK21 Zellen im Vergleich zu nur Ad12- oder Ad2-infizierten BHK21 Zellen zeigten folgendes: Vier Stunden nach der Infektion waren in Ad12-infizierten BHK21 Zellen vergleichsweise wenige Ad12 Genome im Zellkern zu finden (Abb. 19). Wie immer lag in produktiv Ad2-infizierten Hamsterzellen mehr virale DNA vor. In den Kernen hCAR transfizierter und Ad12-infizierter BHK21 Zellen war soviel virale DNA vorhanden, wie bisher nur in produktiv infizierten Zellsystemen gefunden werden konnte. Die Menge der nachweisbaren Ad12 DNA stieg 24 h nach der Ad12 Infektion hCAR transfizierter Hamsterzellen sogar an.

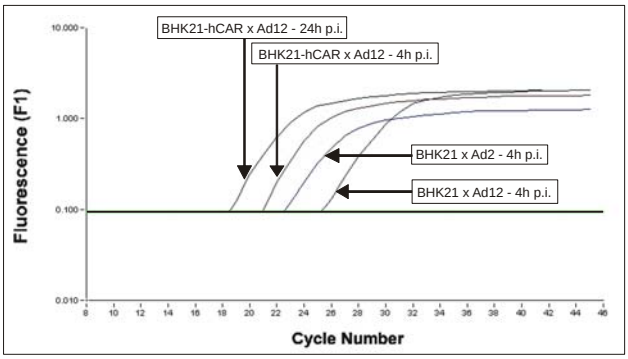


Abb. 19
Relative quantitative PCR Analyse von naïven oder hCAR transfizierten und Ad2 oder Ad12 infizierten BHK21 Zellen.
BHK21 Zellen wurden mit dem hCAR Genkonstrukt transfiziert, bevor sie 24 h später mit 30 PFU Ad12 pro Zelle infiziert wurden. 4 bzw. 24 h p.i. wurde die nukleäre DNA der transfizierten Zellen, 4 h p.i. die nukleäre DNA der nicht transfizierten aber Ad12 oder Ad2 infizierten BHK21 Zellen isoliert. Jeweils 100 ng DNA wurden zur quantitativen LightCycler Methode (Roche) mit Sybr Green verwendet. Je geringer die Anzahl der Zyklen ist, bei der die Kurve in die exponentielle Phase geht, desto grösser war die Anzahl von Ad12 DNA Molekülen in den Zellkernen.

Die Expression des menschlichen CAR Proteins in BHK21 Zellen führte 4 h p.i. zur Aufnahme grosser Mengen von Ad12 DNA in die Hamsterzellkerne. Die Zunahme der Menge nachweisbarer Ad12 DNA 24 h p.i. in den hCAR transfizierten Zellen nach Ad12 Infektion ließ auf virale DNA Replikation schliessen.

13. *De novo* Synthese Ad12 viraler DNA in hCAR transfizierten BHK21 Zellen

Ad12 DNA Replikation in den hCAR exprimierenden BHK21 Zellen wurde mittels metabolischer Markierung mit 5-BrdU der neusynthetisierten DNA bestätigt. Die Daten in Abb. 20 (oben) dokumentieren die *de novo* Synthese von Ad12 DNA 30 h p.i.

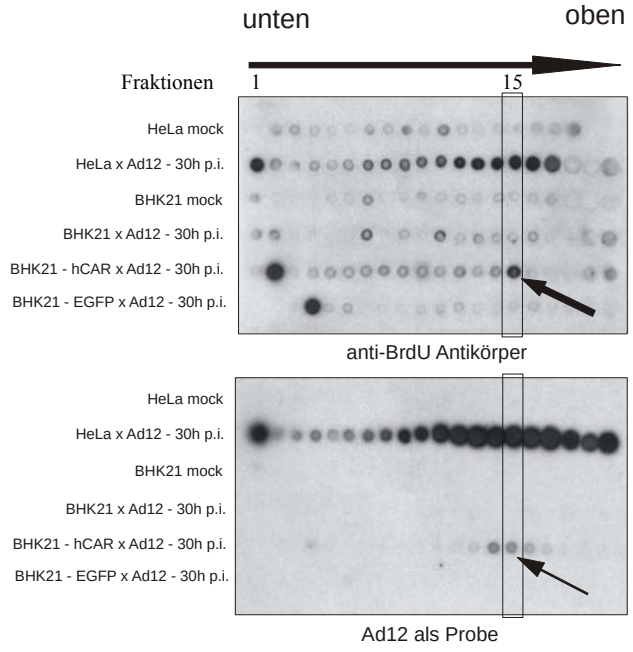


Abb. 20
Replikation von Ad12 DNA.
BHK21 Zellen wurden mit einem hCAR oder EGFP exprimierenden Vektor transfiziert und 24 Stunden später mit Ad12 infiziert. Die neusynthetisierte DNA wurde durch Zugabe von 5-BrdU 28 h p.i. markiert. Die gesamte intrazelluläre DNA wurde durch Dichtegradienten zentrifugation im alkalischen Sucrosegradienten 30 h p.i. analysiert. Die gesammelten Gradientenfraktionen wurden auf eine Nylonmembran gespottet und mit einem Kaninchen anti-BrdU-Antikörper auf die Inkorporation von BrdU untersucht. Zur Hybridisierung mit ^{32}P-markierter Ad12 DNA wurde die Membran durch zweimaliges Waschen bei 85 °C in einer Lösung, bestehend aus 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.2) und 0.001 % SDS, von Antikörperkomplexen befreit (stripping). DNA von schein-transfizierten und schein- oder Ad12-infizierten BHK21 Zellen sowie von schein- oder Ad12-infizierten HeLa Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll analysiert. Mit den Peak Fraktionen vergleichbare Proben anderer Gradienten, welche innerhalb der Markierung liegen, wurden ebenfalls durch Southern Transfer analysiert.

In produktiv infizierten menschlichen HeLa Zellen wurde wesentlich mehr Ad12 DNA *de novo* synthetisiert, welche im alkalischen Sucrosegradienten an der gleichen Position sedimentierte wie die DNA in den hCAR komplementierten und Ad12 infizierten Hamsterzellen. Schein-infizierte Zellen oder nur Ad12 infizierte BHK21 Zellen, die nicht mit hCAR transfiziert worden waren, zeigten keinerlei Hinweise auf Ad12 synthetisierte DNA. *De novo* synthetisierte zelluläre DNA konnte in schein-infizierten HeLa oder BHK21 und in nur Ad12-infizierten BHK21 Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Zellen waren vermutlich

während der 5-BrdU Markierungsphase, nämlich die letzten 2 h vor der Analyse, in diesen Fällen bereits konfluent. Das Zellwachstum war dadurch stark eingeschränkt. Die Nylonmembran mit den aufgetragenen Fraktionen (Abb. 20 oben) wurde durch zweimaliges Waschen bei 85 °C in einer Lösung, bestehend aus 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.2) und 0.001 % SDS, von Antikörperkomplexen befreit (stripping). Anschliessend wurde mit einer radioaktiven Ad12 DNA Sonde hybridisiert. Neben Ad12 infizierten HeLa Zellen wiesen nur hCAR transfizierte und Ad12 infizierte BHK21 Zellen Ad12 spezifische Signale an genau den Positionen der *de novo* Synthese viraler DNA auf (Abb. 20 unten, Vergleich der Rechteckmarkierung).

Die *de novo* synthetisierte DNA der markierten Peakfraktionen aus Abb. 20 a und b sollte noch weiter zur zweifelsfreien Identifizierung von Ad12 DNA analysiert werden. Dazu wurde die Fraktion 15 aller Gradienten mit *EcoRI* geschnitten und durch Southern Transfer analysiert. Das Restriktionsmuster identifizierte die DNA der Peakfraktionen eindeutig als Ad12 DNA (Abb. 21). Die Daten zeigten auch, dass komplette Ad12 Genome repliziert wurden, da alle *EcoRI* Restriktionsfragmente nachweisbar waren (Abb 21).

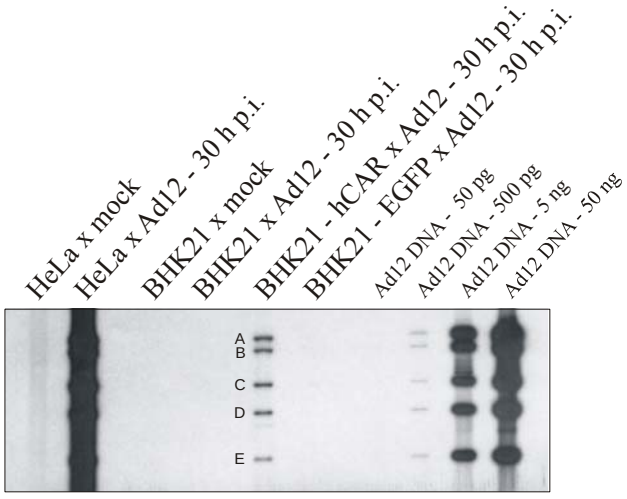


Abb. 21
Analyse der Gradienten-Peakfraktionen durch Southern Transfer.
Die DNA der Peakfraktionen wurde zur Southern Transfer Analyse mit HCl neutralisiert, mit Ethanol präzipitiert, mit *EcoRI* geschnitten und in einem 0.7 %-igen Agarosegel durch Elektrophorese getrennt. Hybridisiert wurde mit einer Sonde von ^{32}P-markierter Ad12 DNA. Gereinigte Ad12 DNA wurde zur Kontrolle in der gleichen Elektrophorese analysiert. Die Positionen der *EcoRI* Ad12 DNA Fragmente sind durch die Buchstaben A-E identifiziert.

Analysen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion zeigten, dass die Ad12 DNA Replikation in diesen hCAR-transfizierten BHK21 Zellen die virale DNA bis mindestens 72 h p.i. in den Zellen akkumulieren liess (Abb. 22). Die Menge der importierten parentalen Ad12 DNA (Spuren 2 und 6 h p.i.) nahm zunächst ab, wurde aber mit Beginn der Ad12 DNA Replikation kontinuierlich vermehrt.

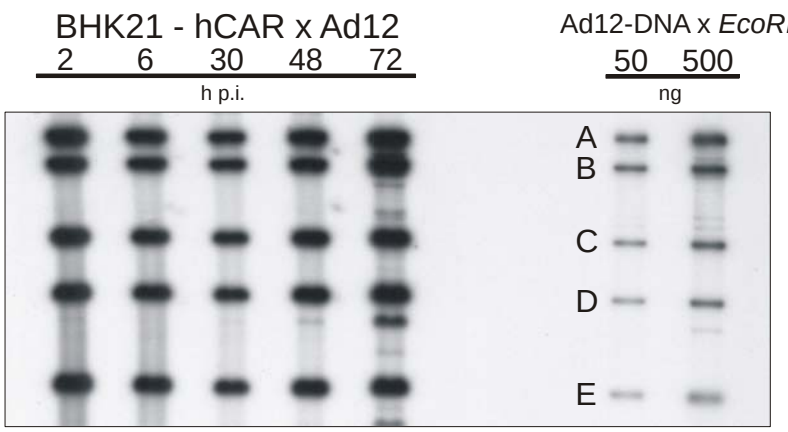


Abb. 22
Zeitlicher Verlauf der Ad12 DNA Replikation in hCAR transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen.
Gesamte intrazelluläre DNA von hCAR-transfizierten und 24 h später Ad12-infizierten BHK21 Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion extrahiert, mit Ethanol präzipitiert, mit *EcoRI* geschnitten, und die Fragmente wurden in einem 0.7 %-igen Agarosegel elektrophoretisiert. Nach dem Southern Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde diese mit einer Sonde von ^{32}P-markierter Ad12 DNA hybridisiert. Gereinigte Ad12 DNA wurde zur Kontrolle in der gleichen Elektrophorese analysiert. Die Positionen der *EcoRI* Ad12 DNA Fragmente sind durch die Buchstaben A-E gekennzeichnet.

Ich schliesse daraus, dass die Expression des hCAR Gens in nicht-permissiven Hamsterzellen eine teilweise Permissivität für limitierte Ad12 DNA Replikation in diesen Zellen zulässt. Möglicherweise wird die Replikation durch die erhöhte Aufnahme von Ad12 DNA und die vermehrte Verfügbarkeit Ad12 viraler DNA Genome in den Kernen der Hamsterzellen ermöglicht.

14. Transkriptionsanalyse einiger früher und später Ad12 Gene

Der erhöhte Import Ad12 viraler DNA in hCAR-transfizierte BHK21 Zellen führt zur Ad12 DNA Replikation. Welche Effekte aber resultieren daraus für die Transkription früher oder später Ad12 Gene?

Die Transkription des E1A, des pTP, des Penton und des Fiber Proteins wurde 30 h nach der Ad12 Infektion mittels relativer quantitativer RT-PCR im LightCycler quantifiziert. Den Transkriptionsdaten Ergebnisse von EGFP-transfizierten und Ad12-superinfizierten BHK21 Zellen als interne Kontrolle wurde der Wert 1 zugewiesen, zu dem die Transkriptionslevel von Ad12-infizierten HeLa oder hCAR-transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen in Relation gesetzt wurden. Die Transkription der Ad12 E1A Region in den hCAR exprimierenden Ad12 infizierten BHK21 Zellen war etwa 6-fach reduziert im Vergleich zum

produktiven humanen Zellsystem, aber 50-fach höher als im unkomplementierten BHK21 Zellsystem (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleiche der viralen Genexpression in Ad12 infizierten HeLa, BHK21 und hCAR transfizierten BHK21 Zellen.

\	BHK21 – EGFP x Ad12 – 30 h p.i.	BHK21 – hCAR x Ad12 – 30 h p.i.	HeLa x Ad12 – 30 h p.i.
E1A	1	5.25×10^1	3.41×10^2
pTP	1	10^2	5×10^4
Penton	1	5.4×10^1	5.4×10^4
Fiber	1	5.88×10^2	1.17×10^6

Zellen wurden mit 30 PFU Ad12 pro Zelle infiziert und die gesamte RNA wurde 30 h p.i. isoliert. Nach reverser Transkription von 500 ng RNA wurde 1/10 der synthetisierten cDNA zur quantitativen LightCycler Methode mit Sybr Green eingesetzt. Zur relativen Quantifizierung wurden die detektierten Mengen Ad12 spezifischer cDNA in GFP exprimierenden und Ad12 infizierten BHK21 Zellen mit dem Wert 1 standardisiert.

Die Transkriptionsaktivität des pTP Gens in hCAR exprimierenden Hamsterzellen war etwa 500 mal reduziert, verglichen mit Ad12-infizierten HeLa Zellen, aber 100-fach höher als in Ad12-infizierten BHK21 Zellen ohne hCAR Expression. Die Transkription der späten Fiber- und Pentongene in den hCAR komplementierten Hamsterzellen war ebenfalls im Vergleich zu den nur Ad12-infizierten BHK21 Zellen erhöht, die Transkription des Fibergens sogar um den Faktor 600. Die geringen Mengen von Ad12 DNA in Ad12-infizierten BHK21 Zellen könnten von einer Kontamination parentaler DNA oder von einer sehr niedrigen Transkription später Ad12 Gene stammen.

Zur Kontrolle wurden alle PCR-Produkte der LightCycler Reaktionen elektrophoretisch in einem Agarosegel getrennt und mittels Ethidiumbromidfärbung am Transluminator sichtbar gemacht (Abb. 23). Die Menge der DNA Produkte im Gel ermöglichte einen Überblick über die Verhältnisse der Transkriptionsaktivitäten Ad12 viraler Gene in den infizierten Zellen. Dadurch, dass die im Gel sichtbaren Produkte alle nach 40 PCR Zyklen aufgetragen wurden, hatten die Produktamplifikationen fast überall bereits die gesättigte Plateauphase erreicht. Erkennbare Unterschiede fallen somit nicht so gravierend aus.Präzisere Ergebnisse lieferte natürlich die Berechnung der LightCycler Ergebnisse. Die Expression des β-Aktin Gens (Kalibrator) war in allen Zellen gleich. Die gewählten Primer konnten die DNA-Sequenz des menschlichen sowie des Hamster β-Aktins mit gleicher Effizienz amplifizieren.

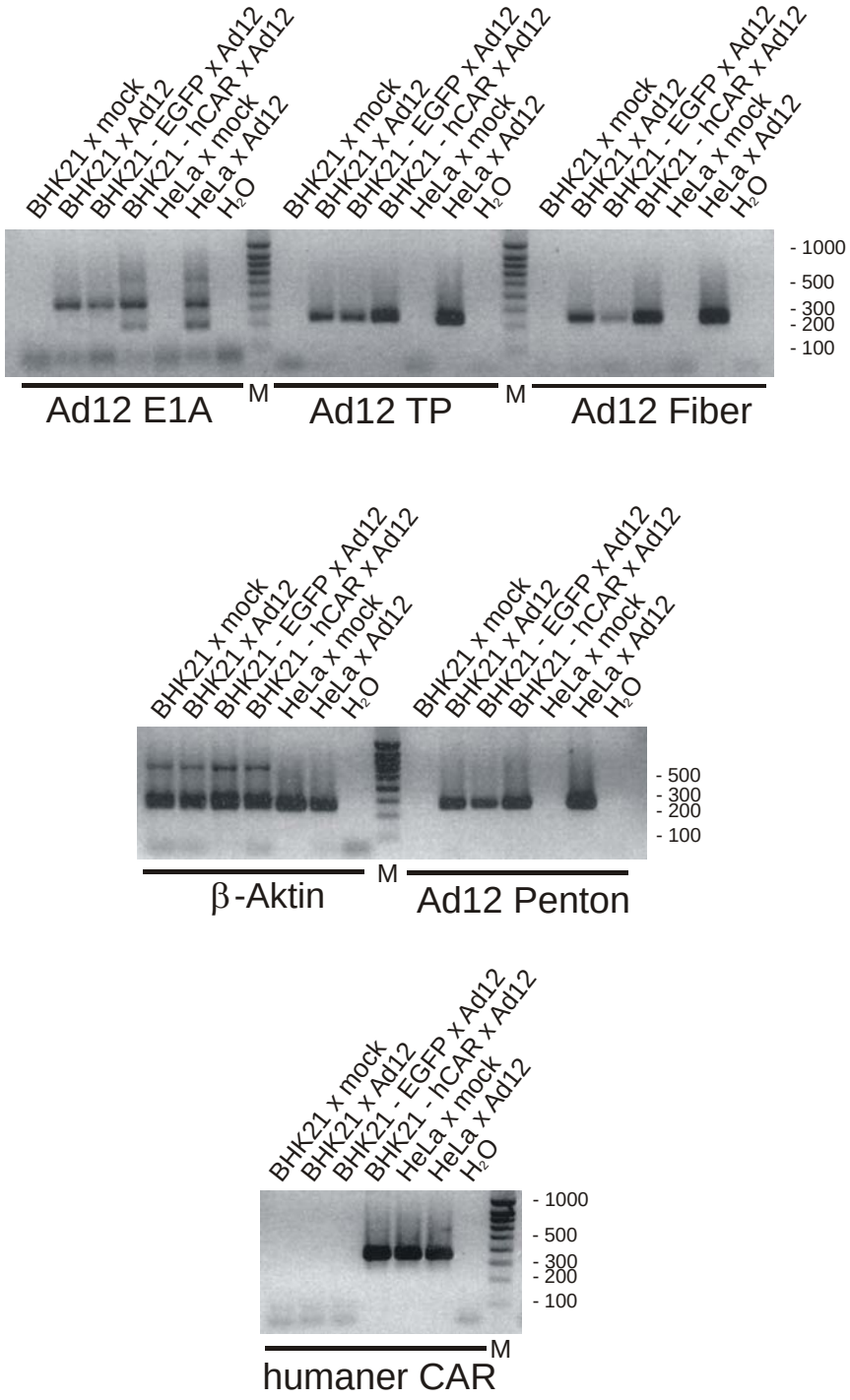


Abb. 23
Kontrolle amplifizierter Fragmente der LightCycler Methode.
PCR Produkte der quantitativen RT-PCR LightCycler Methode (Tabelle 1), wurden in einem 1 %-igen Agarosegel getrennt und nach Ethidiumbromidfärbung an einem Geldokumentationsgerät sichtbar gemacht. Amplifikationsprodukte der cDNA der Ad12 viralen Gene E1A, TP, Fiber und Penton, sowie die Kontrollamplifikationen des humanen β-Aktingens und des hCAR Gens wurden immer nach gleichem Muster aufgetragen. Fragmentgrössen des co-elektrophoretisierten DNA Standards sind auf der rechten Seite angegeben.

Wir untersuchten weiterhin das Expressionsprofil von Ad12 Genen in hCAR transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen für gesamtzelluläre, 30 h p.i. isolierte RNA (Abb. 24). Im Gegensatz zu abortiv infizierten BHK21 Zellen (Abb. 6B) waren in hCAR-transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen die Transkriptionsaktivitäten aller frühen Ad12 Gene stark erhöht. Zudem wurde eine geringe Transkription der untersuchten späten Ad12 Gene beobachtet. Im Vergleich zum produktiven System von Ad12-infizierten menschlichen HeLa Zellen (Abb. 6A) war die Transkription später viraler Gene zwar gering, aber offensichtlich detektierbar, im Gegensatz zu nur Ad12-infizierten BHK21 Zellen, in denen keine Transkription später Gene stattfand.

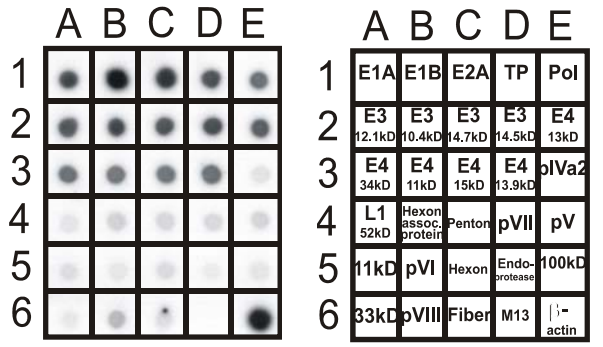


Abb. 24
Erhöhte Expression von Ad12 Genen in hCAR transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen.
BHK21 Zellen wurden mit einem hCAR exprimierenden Vektor transfiziert und 24 h später mit Ad12 infiziert. Gesamt-RNA wurde 30 h p.i. isoliert und in Anwesenheit von ^{32}P revers transkribiert. ^{32}P-markierte cDNA wurde zur Hybridisierung an die M13-Ad12 ssDNA Arrays verwendet.

Folglich konnten wir durch Anwendung der „Echtzeit-RT-PCR“ und der Microarray Analyse nachweisen, dass die erhöhte Aufnahme von Ad12 Genomen in die Kerne von hCAR exprimierenden und Ad12-infizierten Hamsterzellen zur Aktivierung früher sowie später viraler Transkripte in den ansonsten nur abortiv für Ad12 zu infizierenden Hamsterzellen führte.

15. Expression des späten Ad12 Fiberproteins in hCAR exprimierenden Hamsterzellen

Die Tatsache, dass das Ad12 Fibergen in hCAR exprimierenden und Ad12 infizierten BHK21 Zellen 30 h p.i. transkribiert wurde, erforderte den Nachweis des Fiberproteins. Western Transfer Analysen mit einem Kaninchenantikörper gegen das Ad12 Fiberprotein zeigten, dass 30h p.i. grosse Mengen dieses späten Proteins in Ad12 infizierten HeLa Zellen synthetisiert wurden (Abb. 25). Immerhin geringe Mengen wurden in hCAR exprimierenden, Ad12-infizierten BHK21 Zellen detektiert. Ad12 infizierte Hamsterzellen, die zuvor mit dem EGFP

Gen als negative Kontrolle transfiziert worden waren, wiesen keinerlei Synthese des Ad12 Fiberproteins auf.

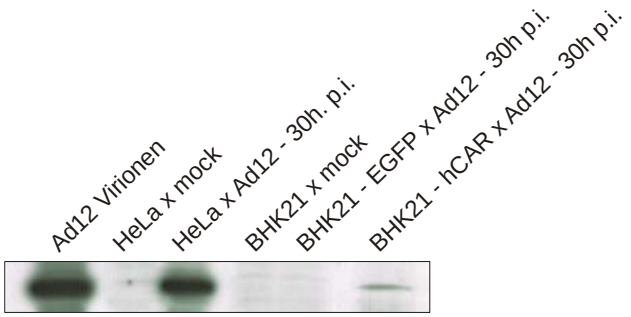


Abb. 25
Expression des späten Ad12 Fiberproteins in Ad12 infizierten hCAR exprimierenden BHK21 Zellen. Proteinextrakte von hCAR- oder EGFP-transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen wurden auf die Präsenz des Ad12 Fiberproteins durch Western Transfer Analyse mit einem polyklonalen Kaninchenantiserum gegen das Ad12 Fiberprotein untersucht. Proteinpräparationen von schein-infizierten HeLa oder BHK21 Zellen sowie von Ad12-infizierten HeLa Zellen und von gereinigten Ad12 Virionen wurden zur Kontrolle in der gleichen Elektrophorese analysiert.

In früheren Projekten konnte niemals eine Synthese später viraler Gene in Ad12 infizierten BHK21 Zellen beobachtet werden. Auch Hamster Zellinien, die durch Komplementation eine teilweise Permissivität erlangten (Klimkait und Doerfler, 1985, 1987; Schiedner et al., 1994) und somit eine begrenzte Ad12 DNA Synthese unterstützten, synthetisierten keine späten Ad12 Proteine. Vermutlich reichte ein Überkommen des DNA Replikationsblockes durch Transfektion der Gene von E1A oder pTP (Hösel et al., 2001) nicht aus, um eine produktive Infektion zu initiieren. Vielmehr bedarf es eines Zusammenspiels aller viralen Gene, um das abortive System vollständig zu komplementieren.

E. Diskussion

Menschliches Adenovirus Typ 12 (Ad12) infiziert BHK21 Hamsterzellen abortiv. Nur wenige Ad12 DNA Genome gelangen in den Zellkern der nichtpermissiven Zellen, einige der frühen Gene werden exprimiert, jedoch konnte niemals Ad12 DNA-Replikation nachgewiesen werden. In Ad12 produktiv infizierten menschlichen HeLa Zellen beginnt die Ad12 DNA-Replikation etwa 16 bis 18 h p.i., und 24 h p.i. sind deutlich die Replikationszentren im Zellkern sichtbar (Abb. 5). In Ad12 infizierten BHK21 Zellen konnte eine Zunahme des Ad12 pTP oder der Ad12 DNA in den Kernen nicht nachgewiesen werden. Erst durch die Überexpression des Ad12 pTP Gens, oder weniger effektiv durch die Überexpression des Ad12 E1A Gens, konnte Ad12 DNA Replikation 28 h nach einer Ad12 Infektion transfizierter Zellen erreicht werden. Eine Transfektion mit dem Kontrollplasmiden blieb ohne Effekt für die Ad12 DNA Replikation. Offensichtlich ist die Menge an exprimiertem Ad12 E1A oder pTP Genprodukt in naiven Ad12 infizierten BHK21 Zellen zu gering. Die Menge produzierter Proteine muss erst eine kritische Grenze überschreiten, bevor virale DNA Replikation ermöglicht wird. Zusätzlich könnte die Verteilung und Konzentration der Ad12 Proteine im Zellkern unzureichend in die oder zu den Replikationszentren verlaufen, so dass virale DNA Replikation nicht von statten gehen kann. Augenscheinlich ist alleine die Überexpression des Ad12 pTP in BHK21 Zellen, in Abwesenheit grosser Ad12 E1A Mengen, dazu in der Lage, Ad12 DNA Synthese in der nichtpermissiven Umgebung zu initiieren (Abb. 10 G). Die Initiation der Ad12 DNA Replikation in BHK21 Zellen, welche Ad12 pTP überexprimieren, ist nicht die Folge grosser Mengen des Ad12 E1A Proteins, da es in den Ad12 pTP überexprimierenden Zellen, im Vergleich zu normal Ad12 infizierten BHK21 Zellen, nicht erhöht vorlag. Vielmehr scheint das überexprimierte pTP allein eine ausschlaggebende Rolle bei der Ad12 DNA Replikationsinitiation zu haben. Es ist aber nicht auszuschliessen, dass die geringen Mengen vorhandener Ad12 E1A Proteine mit dem überexprimierten pTP kooperieren und eine unterstützende Wirkung bei der Replikation der Ad12 DNA haben. Alternativ könnte das pTP neue, bisher nicht bekannte Funktionen besitzen, welche die Ad12 DNA Replikation auch ohne Präsenz des Ad12 E1A Proteins antreibt. Es wurde schon gezeigt, dass das terminale Protein eine Rolle bei der Assoziation mit der Kernmatrix spielt (Schaack et al., 1990; Fredman und Engler, 1993). Vielleicht liegt in dieser Funktion des pTP die Ursache, für die Aufhebung des Ad12 DNA Replikationsblock in den nicht permissiven BHK21 Zellen.

BHK21 Zellen, welche die E1A Gene von Ad12 oder Ad2 überexprimieren, produzieren ausreichende Mengen des Ad12 pTP, so dass nach Ad12 Infektion dieser Zellen komplette Ad12 DNA Genome synthetisiert werden (Abb. 10 H/I). Somit stelle ich die These auf, dass die Überexpression der E1A Gene von Ad2 oder Ad12 adenovirale DNA Replikation in nicht permissiven BHK21 Zellen hervorruft. Der wirkliche Grund liegt bei einer Aktivierung des Ad12 pTP Gens. Sicherlich sind auch weitere virale und zelluläre Faktoren in die Ad12 DNA Replikation einbezogen, deren Produktion durch die E1A oder pTP Überexpression beeinflusst sein könnte. Die synthetisierte Ad12 DNA des Ad12 pTP komplementierten BHK21 Systems (Abb. 10 G) verhält sich im Dichtegradienten wie die replizierte DNA im produktiven HeLa Zellen System. Ausserdem wurde die *de novo* synthetisierte DNA der komplementierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen, nach Analyse durch Sedimentation im Dichtegradienten (Abb. 10), eindeutig als Ad12 virale DNA identifiziert (Abb. 11). Es konnte ebenfalls mittels Immunopräzipitation des pTP-DNA Komplexes gezeigt werden, dass *de novo* synthetisierte Ad12 DNA in Ad12 infizierten BHK21 Zellen, welche Ad12 pTP, Ad12 E1A oder Ad2 E1A überexprimieren, an das pTP bindet **(**Abb. 12**).** Auch dieses Ergebnis zeigt, dass pTP als Primer zur Ad DNA Replikation benötig wird. Vielmehr noch bestätigt es, dass es sich um tatsächliche *de novo* Synthese von Ad12 DNA handelt. Damit wird die Möglichkeit, dass es sich vielleicht um Reparatursynthese zuvor abgebauter oder degradierter Ad12 DNA handeln könnte, ausgeschlossen. Das pTP liegt im Ad12 Genomabschnitt E2B. Bei der Überexpression des Ad12 pTP oder E1A Gens oder des Ad2 E1A Gens in BHK21 Zellen bleibt die Transkriptionsrate der anderen E2 Gene, AdPol und DBP, nach der Ad12 Infektion unverändert auf gleichem Niveau wie bei der nicht komplementierten abortiven Infektion von BHK21 Zellen mit Ad12 (Hösel et al., 2001). Das E2A-DBP wird im abortiven wie im produktiven oder komplementierten System in grossen Mengen produziert, die E2B-AdPol wird nur in sehr geringen Mengen, und völlig unbeinflusst von den transfizierten Genen, synthetisiert.

Die Überexpression des Ad12 pTP Gens in Ad12-infizierten BHK21 Zellen führt zur Replikation und Synthese kompletter Ad12 DNA Genome in diesem ansonsten abortiven BHK21 System. Zwei weitere Funktionen der E2 Transkriptionseinheit, DBP und AdPol, werden nicht von der Transfektion des Ad12 pTP oder des E1A Gens von Ad12 oder Ad2 beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Ad12 pTP eine autonome Rolle beim Start der viralen DNA Replikation und Synthese spielen könnte.

In BHK297-C131 Zellen, welche die linksterminalen 18,7 % des Ad5 stabil integriert tragen, und somit konstitutiv die Ad5 E1A und E1B Gene exprimieren, wird nach Ad12 Infektion

ebenfalls bis zu einem gewissen Grade Ad12 DNA repliziert, und in geringem Maße werden späte Gene transkribiert (Klimkait und Doerfler, 1985 und 1987). Die Neusynthese später viraler Ad12 Proteine konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl z.B. das Fiber-mRNA Molekül mit der dreiteiligen Leadersequenz, dem Poly-A Fortsatz und der exakten Nukleotidsequenz völlig intakt war (Schiedner et al., 1994). Es wurde daher zunächst vorgeschlagen, dass ausser dem transkriptionellen und Replikationsblocks der Ad12 DNA, die Translation später Ad12 Gene ebenfalls inhibiert sein könnte. In diesem Zusammenhang war es nicht überraschend, dass die sehr geringen Mengen später mRNAs, die in den pTP oder E1A transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen gefunden werden konnten, nicht in detektierbare Mengen später Proteine, wie z.B. das Fiber Protein, translatiert wurden.

Ein Vergleich der Resultate dieser Arbeit mit denen früherer Veröffentlichungen über Ad12 infizierte Ad5-transformierte BHK297-C131 Zellen zeigte, dass die BHK297-C131 Zellen spezifische mRNAs von späten Ad12 Genen wesentlich stärker transkribiert wurden (Klimkait und Doerfler, 1985 und 1987; Schiedner et al., 1994), als das in pTP oder E1A transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen der Fall war. Der Grund für sehr schwache Transkription später Gene in unseren Transfektionsexperimenten könnte in der nur kurzzeitigen, transienten Expression der Ad12 pTP, Ad12 E1A oder Ad2 E1A Gene liegen. In der späten Phase der Ad12 Infektion, etwa 24 h p.i. oder später, könnten die pTP oder E1A Proteine, oder die Expressionsvektoren selbst, schon degradiert und/oder nicht mehr in ausreichenden Mengen vorhanden gewesen sein, um eine Transkription später Ad12 Gene auf hohem Niveau zu stimulieren.

Adenoviren benutzen den Coxackie und Adenovirus Rezeptor (CAR), um an die Wirtszelle zu binden und sie einzubringen. Ausgenommen den Gruppe-B-Adenoviren, vermittelt der CAR Rezeptor die Adsorption aller anderen Adenovirus Typen mit der Wirtszelle. Eine Adsorption an die Zelle scheint dabei teilweise unabhängig von der Expression der Integrine $\alpha_v\beta$ 3/5 zu sein (Hemmi et al., 1998; Mori et al., 1999; Fechner et al., 2000; Asaoka et al., 2000; You et al., 2001; Fuxe et al., 2003). So konnte die direkte Interaktion des Ad12 Fiberstrukturproteins mit dem CAR nachgewiesen werden (Freimuth et al., 1999). Es war somit anzunehmen, dass dieser Rezeptor für eine effiziente Infektion unabdingbar ist. Antikörper, welche den menschlichen CAR mittels der Western Transfer Methode erkennen, binden auch an das Hamster-CAR Protein, welches in grossen Mengen exprimiert zu werden scheint. (Abb. 17). Die Tatsache, dass der Rezeptor in BHK21 Zellen präsent ist, sagt aber nichts über die Fähigkeit des Ad12 Fiberproteins aus, an den Hamster-CAR binden zu können. Das Hamster-CAR Protein besitzt vermutlich eine vom humanen CAR unterschiedliche Sequenz an der

Binderegion für Adenoviren, welche nicht als Ziel von Ad12 erkannt wird. Zudem sagt das Resultat nicht aus, dass der vom anti-hCAR Antikörper im Westernblot detektierte Hamster-CAR im nativen Zustand gleiche Funktion besitzt wie sein humanes Pendant. Eine physikalische Barriere wie sie für Lungenzellen gefunden wurde (Pickles et al., 2000), oder die Spekulation, dass BHK21 Zellen den CAR nur in unerreichbaren „tight junctions" exprimiert, ist sehr unwahrscheinlich, da Ad2 oder Ad5 grosse Mengen ihrer Genome in den Zellkern der Hamsterzellen einschleusen können. Nichts desto trotz scheinen Ad12 Fiberprotein und Hamster-CAR nicht erfolgreich zu interagieren. (Abb. 14 C/D). Erst die Transfektion und Expression des menschlichen CAR (hCAR) Proteins in den BHK21 Zellen, lässt vermutlich grössere Mengen Ad12 viraler Partikel an die Cytoplasmamembran der Hamsterzellen binden. Schon 4 h p.i. liessen sich grosse Anzahlen Ad12 viraler Genome im Zellkern hCAR-transfizierter und Ad12-infizierter BHK21 Zellen nachweisen (Abb. 19). In den hCAR transfizierten Hamsterzellen waren wesentlich mehr Ad12 Genome als in den naiv Ad12 infizierten BHK21 Zellen zu finden, ja war die Menge Ad12 viraler DNA sogar vergleichbar mit der in produktiv adenovirusinfizierten Zellsystemen (Abb. 19). 24 h p.i. war in den hCAR-transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen ein Anstieg der Ad12 DNA-Menge gegenüber dem 4 h p.i. Wert zu verzeichnen (Abb. 19). Die *de novo* synthetisierte Ad12 DNA konnte mittels metabolischer nichtradioaktiver DNA Markierung und DNA Fraktionierung im Sucrosedichtegradienten nachgewiesen werden (Abb. 20). BrdU markierte DNA verhielt sich genauso wie die in produktiv Ad12 infizierten HeLa Zellen replizierte Ad12 DNA, und konnte mittels Restriktionsanalyse der DNA in den Peakfraktionen zweifelsfrei als Ad12 DNA identifiziert werden (Abb. 21). Analysen zur Expression später Ad12 viraler Gene zeigten zum ersten mal eine Synthese des späten Fiberproteins in hCAR transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Hamsterzellen (Abb. 25). Komplementationssysteme, wie die Doppelinfektion von Ad2 und Ad12 oder die Ad12 Infektion von BHK297-C131 Hamsterzellen, liessen zwar die Transkription detektierbarer Mengen intakter Fiber mRNA zu, eine Translation konnte aber nicht beobachtet werden. Vergleiche der Transkriptionsaktivitäten später Gene zwischen hCAR-transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen mit naiv Ad12-infizierten BHK21 Zellen zeigten eine vielfache Erhöhung der Transkription des Penton- und Fiberproteins in hCAR-transfizierten Hamsterzellen (Tabelle 1). Die Ursache für die detektierbare Translation des Ad12 Fiberproteins in den hCAR-transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen könnte also durch die verhältnismässig grosse Menge präsenter Fiber mRNA erreicht werden. Die Translation des Fiber Proteins in dem hCAR-transfizierten und Ad12 infizierten BHK21

Zellen könnte auch durch ein Anschalten anderer, für die Translation wichtige, zellulärer Gene hervorgerufen worden sein.

Ein Blick auf die Gesamtsituation der Transkriptionsmuster in hCAR transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen zeigt folgendes: Verglichen mit abortiv Ad12-infizierten BHK21 Zellen, ist die Expression früher viraler Gene in hCAR exprimierenden und Ad12 infizierten Zellen stark erhöht. Ausserdem werden alle späten viralen Gene in geringem Maße transkribiert. Die Quantifizierung Ad12 spezifischer Transkripte durch sensitive quantitative „real-time" RT PCR konnte die Ergebnisse der Microarrays bestätigen. In keinem der früher untersuchten komplementierenden Systeme (Klimkait und Doerfler 1985, Schiedner et al., 1994, Hösel et al., 2003) konnte die Synthese später viraler Genprodukte nachgewiesen werden. In dieser Arbeit führte die hCAR Genkomplementation zur Synthese des Fiberproteins in Ad12 infizierten Hamsterzellen. Wir vermuten, dass eine grosse Anzahl physiologisch intakter viraler Genome den Zellkern der Hamsterzellen erreichten. Die gesamte Ad12 Replikationsmaschinerie konnte in den hCAR transfizierten Zellen entfaltet werden, während durch die Transfektion von E1A oder pTP Genen, ebenso wie durch die Komplementation von Ad5-E1A Genen in BHK297-C131 Zellen nur einzelne Funktionen hilfreich waren. Ein Hinweis darauf, dass nicht alle Ad12 Gene in z.B. Ad12 infizierten BHK297-C131 Zellen aktiv waren ist z.B. die Abwesenheit der Ad12 viralen Protease in diesem System, da das translatierte Ad12 pTP nicht zu TP prozessiert wird (Diplomarbeit Dennis Webb, 2001).

Obwohl wir einige zuvor geblockte virale Replikationsschritte in Ad12 infizierten BHK21 Zellen überkommen konnten, haben wir bisher keine Hinweise auf eine Vermehrung infektiöser Partikel gefunden. Möglicher Weise werden nicht alle späten viralen Proteine in den hCAR komplementierten Zellen translatiert oder überhaupt transkribiert. Vielleicht werden die translatierten späten Proteine aber auch in zu geringen Mengen produziert, die einen Zusammenbau reifer und infektiöser Virionen nicht zulassen. Letztlich bleibt das System komplex, jedoch ist die ineffiziente Aufnahme von Ad12 durch Zellen des Syrischen Hamsters eine Schlüsselstufe in der abortiven Interaktion von Ad12 mit BHK21 Zellen.

F. Zusammenfassung

Die Infektion von Adenovirus Typ 12 (Ad12) in Hamsterzellen ist abortiv. Schon Anfang der 1960 Jahre wurde eine sehr hohe Oncogenität von injiziertem Ad12 in neugeborenen Hamstern festgestellt. Die Hamster entwickelten etwa 5-6 Wochen nach der Injektion Tumore (Trentin et al., 1962; Huebner et al., 1962). Die Ad12 DNA wird in Hamsterzellen in den Zellkern eingeschleusst (Doerfler 1968). Dort wurden einige der frühen Ad12 Gene exprimiert (Ortin et al., 1976), jedoch kam es nicht zur Ad12 DNA Replikation. Vielmehr wurde virale DNA in das Wirtsgenom integriert. Die Integration viraler DNA in das Wirtsgenom ist eine Voraussetzung zur Tumorentwicklung in diesem System.

Menschliche HeLa Zellen werden von Ad12, genauso wie von Ad2 oder Ad5, produktiv infiziert. Nach dem Import der viralen DNA in den Kern der Wirtszellen werden die frühen Funktionen aktiviert, danach wird die virale DNA repliziert, gefolgt von der Expression später Gene und der Strukturproteine, wodurch der Zusammenbau und die Freilassung neuer infektiöser Partikel eingeleitet wird. Die Adenovirustypen 2 und 5 sind jedoch, ganz im Gegensatz zu Ad12, in der Lage, auch Hamsterzellen wie BHK21 Zellen produktiv zu infizieren.

In dieser Arbeit wurde nach Ursachen für den DNA Replikationsblock der Ad12 DNA in BHK21 Zellen gesucht. Ein besondere Eigenschaft der Adenoviren sollte dabei näher analysiert werden, nämlich der terminal an beiden DNA Enden kovalent gebundene Proteinprimer für die Adenoviren DNA Replikation, das sog. terminale Protein (TP). Nicht aber das reife TP sondern sein Vorläufer, das präterminale Protein (pTP) besitzt die Primerfunktion. Exprimiert man ausreichende Mengen dieses pTPs in BHK21 Zellen und infiziert 24 h nach der pTP Transfektion mit Ad12, so wird die Ad12 DNA repliziert. Auch eine Überexpression der E1A Gene von Ad2 oder Ad12 in BHK21 Zellen und anschliessende Ad12 Infektion führen zur Neusynthese von Ad12 DNA. Die Überexpression der Ad12 oder Ad2 E1A Gene führt zu einer hohen Expression des pTP, so dass wiederum ausreichend pTP für einer Ad12 DNA Replikation zur Verfügung gestellt wird. Offenbar ist das pTP alleine in der Lage, die Ad12 DNA Replikation in pTP transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen zu ermöglichen. Andere Gene, AdPol und DBP der E2 Region des Adenovirusgenoms, zu der auch das pTP Gen gehört, scheinen in ihrer Aktivität durch die vermehrte Aktivität des pTP Gens nicht beeinflusst zu werden (Hösel et al., 2001). Ob und in wie fern das pTP evtl. noch weitere, bisher unbekannte Funktionen zur Aktivierung zusätzlich benötigter Gene

besitzt, oder ob einfach nur eine Anhäufung des Proteins über eine kritische Grenze zur Replikationsinitiation nötig ist, ist bisher nicht geklärt.

Falls tatsächlich zu wenig pTP in Ad12-infizierten BHK21 Zellen exprimiert wird, stellt sich die Frage, ob überhaupt ausreichend DNA für die Produktion einer ausreichenden pTP Menge im Zellkern der BHK21 Zellen vorhanden ist. Immunfluoreszenzversuche zeigten, dass im Vergleich zu Ad12 infizierten HeLa Zellen nur minimale Mengen von Ad12 Virionen an BHK21 Zellen adsorbierten oder penetrierten. Quantitative PCR-Vergleiche der Ad12 DNA Mengen in abortiv Ad12-infizierten BHK21 Zellen mit produktiv Ad2- oder Ad12-infizierten HeLa oder produktiv Ad2-infizierten BHK21 Zellen untermauerten die Immunfluoreszenz-versuche. Die Ad12 DNA Menge in BHK21 infizierten Zellen lag zu jedem untersuchten Zeitpunkt während der ersten 24 h p.i. mindestens 100-fach unter den viralen Mengen in den produktiv infizierten Systemen.

Ausser den Adenoviren der Gruppe B, verwenden alle anderen Adenovirus Typen zur Infektion ihrer Wirtszellen den Coxackie und Adenovirus Rezeptor (CAR). Westerntransfer Analysen zeigten, dass CAR auch in BHK21 Zellen vorhanden ist, von Ad12 scheinbar aber nicht verwendet werden kann. Hamsterzellen wurden deshalb mit dem Gen für den humanen CAR (hCAR) transfiziert und anschliessend mit Ad12 infiziert. Ad12 DNA gelangte nun in grossen Mengen in den Zellkern hCAR exprimierender BHK21 Zellen. Die Ad1 DNA Mengen waren jetzt vergleichbar mit denen in produktiv Adenovirus-infizierten Zellsystemen. Die Ergebnisse aus quantitativen LightCycler PCR Analysen machten es wahrscheinlich, dass die Ad12 DNA in hCAR transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Zellen sogar repliziert wurde. *De novo* synthetisierte Ad12 DNA in den hCAR transfizierten und Ad12 infizierten BHK21 Hamsterzellen wurden dazu durch Zugabe von 5’-BrdU markiert. Diese konnte nach Trennung im alkalischen Sucrosegradienten, und aufbringen der ausgetropften Fraktionen auf einer Nylonmembran, mittels eines anti-BrdU Antikörpers detektiert werden.

Relative quantitative Transkriptionsanalysen später Ad12 Gene in hCAR exprimierenden Ad12-infizierten BHK21 Zellen zeigten eine starke Transkriptionserhöhung des Fiber- und Pentongens. Durch Westerntransfer Analysen konnte eine Synthese des Fiberproteins nachgewiesen werden. Die Hybridisierungsergebnisse von DNA Microarrays mit 28 Ad12 ORFs mit cDNA aus hCAR-transfizierten und Ad12-infizierten BHK21 Zellen zeigten eine starke Transkription aller frühen Gene. Späte Ad12 Gene wurden schwach, aber in detektierbaren Mengen transkribiert. In weiterführenden Versuchen haben wir bisher keine Hinweise auf eine Vermehrung infektiöser Partikel gefunden. Man hat jedoch bis 72 h p.i vermutlich parentale Virionen mittels Plaque Assay finden können (Daten nicht gezeigt).

Das abortive System Ad12 infizierter Hamsterzellen ist komplex. Die ineffiziente Aufnahme von Ad12 durch Zellen des Syrischen Hamsters ist jedoch eine Schlüsselstufe in der abortiven Interaktion von Ad12 mit BHK21 Zellen und dem oncogenen Verlauf von injiziertem Ad12 in neugeborene Syrische Hamster. Es konnten einige Fragen geklärt werden und neue Fragen stellten sich. Daher möchte ich mit den folgenden zwei Zitaten enden:

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, daß plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat."

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929), amerikanischer Soziologe und Ökonom

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört."

Justus von Liebig (1803-73), deutscher Chemiker, Entdecker des Chloroforms, Begründer der Mineraldüngung in der Landwirtschaft

G. Literaturverzeichnis

Angeletti,P.C. and Engler,J.A. (1998). Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix. *Journal of Virology,* **72,** 2896-2904.

Asaoka,K., Tada,M., Sawamura,Y., Ikeda,J., and Abe,H. (2000). Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor. *Journal of Neurosurgery,* **92,** 1002-1008.

Bablanian,R., Eggers,H.J., and Tamm,I. (1965). Studies on the mechanism of Poliovirus-induced cell damage. I. The relation between Poliovirus-induced metabolic and morphological alterations in cultured cells. *Virology,* **26,** 100-113.

Bai,M., Harfe,B., and Freimuth,P. (1993). Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *J. Virol.,* **67,** 5198-5205.

Bergelson,J.M., Cunningham,J.A., Droguett,G., Kurt-Jones,E.A., Krithivas,A., Hong,J.S., Horwitz,M.S., Crowell,R.L., and Finberg,R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science,* **275,** 1320-1323.

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.,* **72,** 248-254.

Burlingham,B.T. and Doerfler,W. (1971). Three size-classes of intracellular adenovirus deoxyribonucleic acid. *J. Virol.,* **7,** 707-719.

Burnett,R. M., Chiu,W., and Garcea,R. L. (1997). Structural Biology of Viruses. Oxford University Press, New York, 209-238.

Burnette,W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.,* **112,** 195-203.

Challberg,M.D., Desiderio,S.V., and Kelly,T.J., Jr. (1980). Adenovirus DNA replication in vitro: characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A,* **77,** 5105-5109.

Chardonnet,Y. and Dales,S. (1970). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. II. Comparative observations on the penetration of types 1, 5, 7, and 12. *Virology,* **40,** 478-485.

Chardonnet,Y. and Dales,S. (1970). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. *Virology,* **40,** 462-477.

Chen,R.H. and Fuggle,S.V. (1993). In situ cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression. *Am. J. Pathol.,* **143,** 1527-1534.

Chowrira,B.M., Zhao,J., and Lucher,L.A. (1991). Formation Invitro of the Ptp-Dcmp Initiation Complex of Human Adenovirus-Type-12. *Journal of General Virology,* **72,** 427-430.

Chraboczek,J., Ruigrok,R. W. H., and Cusak,S. (1995). Adenovirions Fiber. Doerfler, W. and Boehm, P. eds. Current Topics in Microbiology and Immunology The Molecular Repertoire of Adenovirus I, 164-200. Berlin, Springer Verlag.

Chretien,I., Marcuz,A., Courtet,M., Katevuo,K., Vainio,O., Heath,J.K., White,S.J., and Du,P.L. (1998). CTX, a Xenopus thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. *Eur. J. Immunol.,* **28,** 4094-4104.

Cleat,P.H. and Hay,R.T. (1989). Kinetic-Analysis of Nuclear Factor-I and Its Dna-Binding Domain with the Adenovirus Origin of Replication. *Febs Letters,* **258,** 51-54.

Cleat,P.H. and Hay,R.T. (1989). Co-Operative Interactions Between Nfi and the Adenovirus Dna-Binding Protein at the Adenovirus Origin of Replication. *Embo Journal,* **8,** 1841-1848.

Cohen,C.J., Shieh,J.T., Pickles,R.J., Okegawa,T., Hsieh,J.T., and Bergelson,J.M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A,* **98,** 15191-15196.

Cohen,C.J., Gaetz,J., Ohman,T., and Bergelson,J.M. (2001). Multiple regions within the coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J. Biol. Chem.,* **276,** 25392-25398.

Connor,R.J., Engler,H., Machemer,T., Philopena,J.M., Horn,M.T., Sutjipto,S., Maneval,D.C., Youngster,S., Chan,T.M., Bausch,J., McAuliffe,J.P., Hindsgaul,O., and Nagabhushan,T.L. (2001). Identification of polyamides that enhance adenovirus-mediated gene expression in the urothelium. *Gene Ther.,* **8,** 41-48.

Cotten,M. and Weber,J.M. (1995). The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology,* **213,** 494-502.

Cripe,T.P., Dunphy,E.J., Holub,A.D., Saini,A., Vasi,N.H., Mahller,Y.Y., Collins,M.H., Snyder,J.D., Krasnykh,V., Curiel,D.T., Wickham,T.J., DeGregori,J., Bergelson,J.M., and Currier,M.A. (2001). Fiber knob modifications overcome low, heterogeneous expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor that limits adenovirus gene transfer and oncolysis for human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.,* **61,** 2953-2960.

de Jong,R.N. and van der Vliet,P.C. (1999). Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene,* **236,** 1-12.

de Jong,R.N., Mysiak,M.E., Meijer,L.A., van der,L.M., and van der Vliet,P.C. (2002). Recruitment of the priming protein pTP and DNA binding occur by overlapping Oct-1 POU homeodomain surfaces. *EMBO J.,* **21,** 725-735.

Devaux,C., Cailletboudin,M.L., Jacrot,B., and Boulanger,P. (1987). Crystallization, Enzymatic Cleavage, and the Polarity of the Adenovirus Type-2 Fiber. *Virology,* **161,** 121-128.

Doerfler,W. (1968). The fate of the DNA of adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A,* **60,** 636-643.

Doerfler,W. (1969). Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology,* **38,** 587-606.

Doerfler,W. (1970). Integration of the deoxyribonucleic acid of adenovirus type 12 into the deoxyribonucleic acid of baby hamster kidney cells. *J. Virol.,* **6,** 652-666.

Doerfler,W. and Lundholm,U. (1970). Absence of replication of the DNA of adenovirus type 12 in BHK21 cells. *Virology,* **40,** 754-757.

Egan,C., Jelsma,T.N., Howe,J.A., Bayley,S.T., Ferguson,B., and Branton,P.E. (1988). Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol. Cell Biol.,* **8,** 3955-3959.

Engler,H., Anderson,S.C., Machemer,T.R., Philopena,J.M., Connor,R.J., Wen,S.F., and Maneval,D.C. (1999). Ethanol improves adenovirus-mediated gene transfer and expression to the bladder epithelium of rodents. *Urology,* **53,** 1049-1053.

Enomoto,T., Lichy,J.H., Ikeda,J.E., and Hurwitz,J. (1981). Adenovirus DNA replication in vitro: purification of the terminal protein in a functional form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A,* **78,** 6779-6783.

Esche,H., Schilling,R., and Doerfler,W. (1979). Invitro Translation of Adenovirus Type 12-Specific Messenger-Rna Isolated from Infected and Transformed-Cells. *Journal of Virology,* **30,** 21-31.

Faha,B., Ewen,M.E., Tsai,L.H., Livingston,D.M., and Harlow,E. (1992). Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. *Science,* **255,** 87-90.

Fechner,H., Wang,X., Wang,H., Jansen,A., Pauschinger,M., Scherubl,H., Bergelson,J.M., Schultheiss,H.P., and Poller,W. (2000). Trans-complementation of vector replication versus Coxsackie-adenovirus-receptor overexpression to improve transgene expression in poorly permissive cancer cells. *Gene Therapy,* **7,** 1954-1968.

Feinberg,A.P. and Vogelstein,B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.,* **137,** 266-267.

Felding-Habermann,B., Mueller,B.M., Romerdahl,C.A., and Cheresh,D.A. (1992). Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J. Clin. Invest,* **89,** 2018-2022.

Fitzgerald,D.J., Padmanabhan,R., Pastan,I., and Willingham,M.C. (1983). Adenovirus-induced release of epidermal growth factor and pseudomonas toxin into the cytosol of KB cells during receptor-mediated endocytosis. *Cell,* **32,** 607-617.

Fredman,J.N., Pettit,S.C., Horwitz,M.S., and Engler,J.A. (1991). Linker Insertion Mutations in the Adenovirus Preterminal Protein That Affect Dna-Replication Activity Invivo and Invitro. *Journal of Virology,* **65,** 4591-4597.

Fredman,J.N. and Engler,J.A. (1993). Adenovirus Precursor to Terminal Protein Interacts with the Nuclear Matrix Invivo and Invitro. *Journal of Virology,* **67,** 3384-3395.

Freifelder,D. and Better,M. (1982). Dialysis of small samples in agarose gels. *Anal. Biochem.,* **123,** 83-85.

Freimuth,P. (1996). A human cell line selected for resistance to adenovirus infection has reduced levels of the virus receptor. *J. Virol.,* **70,** 4081-4085.

Freimuth,P., Springer,K., Berard,C., Hainfeld,J., Bewley,M., and Flanagan,J. (1999). Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J. Virol.,* **73,** 1392-1398.

Freimuth,P.I. and Ginsberg,H.S. (1986). Codon Insertion Mutants of the Adenovirus Terminal Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **83,** 7816-7820.

Fuxe,J., Liu,L., Malin,S., Philipson,L., Collins,V.P., and Pettersson,R.F. (2003). Expression of the coxsackie and adenovirus receptor in human astrocytic tumors and xenografts. *International Journal of Cancer,* **103,** 723-729.

Giordano,A., Lee,J.H., Scheppler,J.A., Herrmann,C., Harlow,E., Deuschle,U., Beach,D., and Franza,B.R., Jr. (1991). Cell cycle regulation of histone H1 kinase activity associated with the adenoviral protein E1A. *Science,* **253,** 1271-1275.

Giordano,A., McCall,C., Whyte,P., and Franza,B.R., Jr. (1991). Human cyclin A and the retinoblastoma protein interact with similar but distinguishable sequences in the adenovirus E1A gene product. *Oncogene,* **6,** 481-485.

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

Greber,U.F., Webster,P., Weber,J., and Helenius,A. (1996). The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.*, **15,** 1766-1777.

Greber,U.F. and Fassati,A. (2003). Nuclear import of viral DNA genomes. *Traffic.,* **4,** 136-143.

Grubb,B.R., Pickles,R.J., Ye,H., Yankaskas,J.R., Vick,R.N., Engelhardt,J.F., Wilson,J.M., Johnson,L.G., and Boucher,R.C. (1994). Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature,* **371,** 802-806.

Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.,* **166,** 557-580.

Harlow,E., Whyte,P., Franza,B.R., Jr., and Schley,C. (1986). Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol. Cell Biol.,* **6,** 1579-1589.

Hemmi,S., Geertsen,R., Mezzacasa,A., Peter,I., and Dummer,R. (1998). The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum. Gene Ther.,* **9,** 2363-2373.

Hilger-Eversheim,K. and Doerfler,W. (1997). Clonal origin of adenovirus type 12-induced hamster tumors: nonspecific chromosomal integration sites of viral DNA. *Cancer Res.,* **57,** 3001-3009.

Hilleman,M.R. and Werner,J.H. (1954). Recovery of New Agent from Patients with Acute Respiratory Illness. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,* **85,** 183-188.

Hohlweg,U., Hosel,M., Dorn,A., Webb,D., Hilger-Eversheim,K., Remus,R., Schmitz,B., Buettner,R., Schramme,A., Corzilius,L., Niemann,A., and Doerfler,W. (2003). Intraperitoneal dissemination of Ad12-induced undifferentiated neuroectodermal hamster tumors: de novo methylation and transcription patterns of integrated viral and of cellular genes. *Virus Res.,* **98,** 45-56.

Holmes,D.S. and Quigley,M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.,* **114,** 193-197.

Honda,T., Saitoh,H., Masuko,M., Katagiri-Abe,T., Tominaga,K., Kozakai,I., Kobayashi,K., Kumanishi,T., Watanabe,Y.G., Odani,S., and Kuwano,R. (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.,* **77,** 19-28.

Hosel,M., Webb,D., Schroer,J., Schmitz,B., and Doerfler,W. (2001). Overexpression of the adenovirus type 12 (Ad12) pTP or E1A gene facilitates Ad12 DNA replication in nonpermissive BHK21 hamster cells. *J. Virol.,* **75,** 10041-10053.

Hosel,M., Webb,D., Schroer,J., and Doerfler,W. (2003). The abortive infection of Syrian hamster cells with human adenovirus type 12. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* **272,** 415-440.

Huang,J.T. and Schneider,R.J. (1991). Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell,* **65,** 271-280.

Huebner,R.J., Rowe,W.P., and Lane,W.T. (1962). Oncogenic Effects in Hamsters of Human Adenovirus Types 12 and 18. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **48,** 2051-&.

Jelsma,T.N., Howe,J.A., Mymryk,J.S., Evelegh,C.M., Cunniff,N.F., and Bayley,S.T. (1989). Sequences in E1A proteins of human adenovirus 5 required for cell transformation, repression of a transcriptional enhancer, and induction of proliferating cell nuclear antigen. *Virology,* **171,** 120-130.

Juttermann,R., Weyer,U., and Doerfler,W. (1989). Defect of adenovirus type 12 replication in hamster cells: absence of transcription of viral virus-associated and L1 RNAs. *J. Virol.,* **63,** 3535-3540.

Kaiser,A.D. and Hogness,D.S. (1960). The transformation of Escherichia coli with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J. Mol. Biol.,* **2,** 392-415.

King,A.J. and Vandervliet,P.C. (1994). A Precursor Terminal Protein Trinucleotide Intermediate During Initiation of Adenovirus Dna-Replication - Regeneration of Molecular Ends In-Vitro by A Jumping Back Mechanism. *Embo Journal,* **13,** 5786-5792.

King,A.J., Teertstra,W.R., and Vandervliet,P.C. (1997). Dissociation of the protein primer and DNA polymerase after initiation of adenovirus DNA replication. *Journal of Biological Chemistry,* **272,** 24617-24623.

Klimkait,T. and Doerfler,W. (1985). Adenovirus Type-2 and Type-5 Functions Elicit Replication and Late Expression of Adenovirus-Type-12 Dna in Hamster-Cells. *Journal of Virology,* **55,** 466-474.

Klimkait,T. and Doerfler,W. (1987). E1B Functions of Type-C Adenoviruses Play A Role in the Complementation of Blocked Adenovirus-Type-12 Dna-Replication and Late Gene-Transcription in Hamster-Cells. *Virology,* **161,** 109-120.

Kuhlmann,I., Achten,S., Rudolph,R., and Doerfler,W. (1982). Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation. *EMBO J.,* **1,** 79-86.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* **227,** 680-685.

Lee,W.S., Kao,C.C., Bryant,G.O., Liu,X., and Berk,A.J. (1991). Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor. *Cell,* **67,** 365-376.

Li,E., Brown,S.L., Von Seggern,D.J., Brown,G.B., and Nemerow,G.R. (2000). Signaling antibodies complexed with adenovirus circumvent CAR and integrin interactions and improve gene delivery. *Gene Ther.,* **7,** 1593-1599.

Li,Y., Pong,R.C., Bergelson,J.M., Hall,M.C., Sagalowsky,A.I., Tseng,C.P., Wang,Z., and Hsieh,J.T. (1999). Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res.,* **59,** 325-330.

Lichy,J.H., Field,J., Horwitz,M.S., and Hurwitz,J. (1982). Separation of the Adenovirus Terminal Protein-Precursor from Its Associated Dna-Polymerase - Role of Both Proteins in the Initiation of Adenovirus Dna-Replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences,* **79,** 5225-5229.

Liu,F. and Green,M.R. (1990). A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Cell,* **61,** 1217-1224.

Logan,J. and Shenk,T. (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A,* **81,** 3655-3659.

Lonberg-Holm,K., Crowell,R.L., and Philipson,L. (1976). Unrelated animal viruses share receptors. *Nature,* **259,** 679-681.

Lucher,L.A. (1990). Adenovirus type 12 tumour antigen synthesis differs during infection of permissive and non-permissive cells. *J. Gen. Virol.,* **71 (Pt 3),** 579-583.

Luftig,R.B. and Weihing,R.R. (1975). Adenovirus binds to rat brain microtubules in vitro. *J. Virol.,* **16,** 696-706.

McDonell,M.W., Simon,M.N., and Studier,F.W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.,* **110,** 119-146.

Mirza,M.A. and Weber,J. (1979). Uncoating of adenovirus type 2. *J. Virol.,* **30,** 462-471.

Mirza,M.A. and Weber,J. (1982). Structure of Adenovirus Chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta,* **696,** 76-86.

Morgan,C., Rosenkranz,H.S., and Mednis,B. (1969). Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Entry and uncoating of adenovirus. *J. Virol.,* **4,** 777-796.

Mori,T., Arakawa,H., Tokino,T., Mineura,K., and Nakamura,Y. (1999). Significant increase of adenovirus infectivity in glioma cell lines by extracellular domain of hCAR. *Oncology Research,* **11,** 513-521.

Nagata,K., Guggenheimer,R.A., Enomoto,T., Lichy,J.H., and Hurwitz,J. (1982). Adenovirus DNA replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A,* **79,** 6438-6442.

Nathans,D. and Smith,H.O. (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu. Rev. Biochem.,* **44,** 273-293.

Neumann,E., Schaefer-Ridder,M., Wang,Y., and Hofschneider,P.H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.,* **1,** 841-845.

Nevins,J.R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science,* **258,** 424-429.

Norrby,E. and Skaaret,P. (1967). The relationship between soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. 3. Immunological identification of fiber antigen and isolated vertex capsomer antigen. *Virology,* **32,** 489-502.

Norrby,E. (1969). The structural and functional diversity of Adenovirus capsid components. *J. Gen. Virol.,* **5,** 221-236.

Norrby,E. and Ankerst,J. (1969). Biological characterization of structural components of Adenovirus type 12. *J. Gen. Virol.,* **5,** 183-194.

Okegawa,T., Li,Y., Pong,R.C., Bergelson,J.M., Zhou,J., and Hsieh,J.T. (2000). The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res.,* **60,** 5031-5036.

Ortin,J., Scheidtmann,K.H., Greenberg,R., Westphal,M., and Doerfler,W. (1976). Transcription of the genome of adenovirus type 12. III. Maps of stable RNA from productively infected human cells and abortively infected and transformed hamster cells. *J. Virol.,* **20,** 355-372.

Patan,I., Seth,P., FitzGerald,D., and Willingham,M. (1986). Adenovirus Entry into Cells: Some new Observations on an Old Problem. Al Notkins. MBA Oldstone , 141-146. New York, Springer Verlag.

Pettit,S.C., Horwitz,M.S., and Engler,J.A. (1989). Mutations of the Precursor to the Terminal Protein of Adenovirus Serotype-2 and Serotype-5. *Journal of Virology,* **63,** 5244-5250.

Pickles,R.J., McCarty,D., Matsui,H., Hart,P.J., Randell,S.H., and Boucher,R.C. (1998). Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. *J. Virol.,* **72,** 6014-6023.

Pickles,R.J., Fahrner,J.A., Petrella,J.M., Boucher,R.C., and Bergelson,J.M. (2000). Retargeting the coxsackievirus and adenovirus receptor to the apical surface of polarized epithelial cells reveals the glycocalyx as a barrier to adenovirus-mediated gene transfer. *J. Virol.,* **74,** 6050-6057.

Prchla,E., Plank,C., Wagner,E., Blaas,D., and Fuchs,R. (1995). Virus-mediated release of endosomal content in vitro: different behavior of adenovirus and rhinovirus serotype 2. *J. Cell Biol.,* **131,** 111-123.

Pronk,R., Stuiver,M.H., and Vandervliet,P.C. (1992). Adenovirus Dna-Replication - the Function of the Covalently Bound Terminal Protein. *Chromosoma,* **102,** S39-S45.

Pronk,R. and Vandervliet,P.C. (1993). The Adenovirus Terminal Protein Influences Binding of Replication Proteins and Changes the Origin Structure. *Nucleic Acids Research,* **21,** 2293-2300.

Pronk,R., Vandriel,W., and Vandervliet,P.C. (1994). Replication of Adenovirus Dna In-Vitro Is Atp-Independent. *Febs Letters,* **337,** 33-38.

Pruijn,G.J., van Driel,W., and van der Vliet,P.C. (1986). Nuclear factor III, a novel sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells stimulating adenovirus DNA replication. *Nature,* **322,** 656-659.

Rodriguez,E. and Everitt,E. (1996). Adenovirus uncoating and nuclear establishment are not affected by weak base amines. *J. Virol.,* **70,** 3470-3477.

Roovers,D.J., Vanderlee,F.M., Vanderwees,J., and Sussenbach,J.S. (1993). Analysis of the Adenovirus Type-5 Terminal Protein-Precursor and Dna-Polymerase by Linker Insertion Mutagenesis. *Journal of Virology,* **67,** 265-276.

Rouse,H.C., Strohl,W.A., and Schlesinger,R.W. (1966). Properties of cells derived from adenovirus-induced hamster tumors by long-term in vitro cultivation. I. Clonal stability of three biological characteristics. *Virology,* **28,** 633-644.

Rowe,W.P., Huebner,R.J., Gilmore,L.K., Parrott,R.H., and Ward,T.G. (1953). Isolation of A Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,* **84,** 570-573.

Ruigrok,R.W.H., Barge,A., Albigesrizo,C., and Dayan,S. (1990). Structure of Adenovirus Fiber .2. Morphology of Single Fibers. *Journal of Molecular Biology,* **215,** 589-596.

Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science,* **239,** 487-491.

Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A,* **74,** 5463-5467.

Schaack,J., Ho,W.Y.W., Freimuth,P., and Shenk,T. (1990). Adenovirus Terminal Protein Mediates Both Nuclear Matrix Association and Efficient Transcription of Adenovirus Dna. *Genes & Development,* **4,** 1197-1208.

Scheuermann,R.H. and Bauer,S.R. (1993). Polymerase Chain Reaction-Based Messenger-Rna Quantification Using An Internal Standard - Analysis of Oncogene Expression. *Methods in Enzymology,* **218,** 446-473.

Schiedner,G., Schmitz,B., and Doerfler,W. (1994). Late transcripts of adenovirus type 12 DNA are not translated in hamster cells expressing the E1 region of adenovirus type 5. *J. Virol.,* **68,** 5476-5482.

Seth,P., Fitzgerald,D.J., Willingham,M.C., and Pastan,I. (1984). Role of a low-pH environment in adenovirus enhancement of the toxicity of a Pseudomonas exotoxin-epidermal growth factor conjugate. *J. Virol.,* **51,** 650-655.

Siebert,P.D. and Larrick,J.W. (1993). PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques,* **14,** 244-249.

Smith,D.B. and Johnson,K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene,* **67,** 31-40.

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

Stabel,S., Doerfler,W., and Friis,R.R. (1980). Integration sites of adenovirus type 12 DNA in transformed hamster cells and hamster tumor cells. *J. Virol.,* **36,** 22-40.

Steven,A.C., Trus,B.L., Booy,F.P., Cheng,N.Q., Zlotnick,A., Caston,J.R., and Conway,J.F. (1997). The making and breaking of symmetry in virus capsid assembly: glimpses of capsid biology from cryoelectron microscopy. *Faseb Journal,* **11,** 733-742.

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

Stillman,B.W., Topp,W.C., and Engler,J.A. (1982). Conserved Sequences at the Origin of Adenovirus Dna-Replication. *Journal of Virology,* **44,** 530-537.

Stoker,M. and MacPherson,I. (1964). Syrian Hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivates. *Nature,* **203,** 1355-1357.

Strohl,W.A., Rouse,H.C., and Schlesinger,R.W. (1966). Properties of cells derived from adenovirus-induced hamster tumors by long-term in vitro cultivation. II. Nature of the restricted response to type 2 adenovirus. *Virology,* **28,** 645-658.

Strohl,W.A., Rouse,H., Teets,K., and Schlesinger,R.W. (1970). The response of BHK21 cells to infection with type 12 adenovirus. 3. Transformation and restricted replication of superinfecting type 2 adenovirus. *Arch. Gesamte Virusforsch.,* **31,** 93-112.

Stuiver,M.H. and Vandervliet,P.C. (1990). Adenovirus Dna-Binding Protein Forms A Multimeric Protein Complex with Double-Stranded Dna and Enhances Binding of Nuclear Factor-I. *Journal of Virology,* **64,** 379-386.

Sturm,R.A. and Herr,W. (1988). The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature,* **336,** 601-604.

Sturm,R.A., Das,G., and Herr,W. (1988). The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.,* **2,** 1582-1599.

Sutter,D., Westphal,M., and Doerfler,W. (1978). Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12-transformed hamster cells. *Cell,* **14,** 569-585.

Svensson,U. (1985). Role of vesicles during adenovirus 2 internalization into HeLa cells. *J. Virol.,* **55,** 442-449.

Swaminathan,S. and Thimmapaya,B. (1995). Regulation of adenovirus E2 transcription unit. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* **199 (Pt 3),** 177-194.

Tamanoi,F. and Stillman,B.W. (1982). Function of Adenovirus Terminal Protein in the Initiation of Dna-Replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences,* **79,** 2221-2225.

Tolun,A., Alestrom,P., and Pettersson,U. (1979). Sequence of inverted terminal repetitions from different adenoviruses: demonstration of conserved sequences and homology between SA7 termini and SV40 DNA. *Cell,* **17,** 705-713.

Tomko,R.P., Xu,R., and Philipson,L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A,* **94,** 3352-3356.

Trentin,J.J., Taylor,G., and Yabe,Y. (1962). Quest for Human Cancer Viruses. *Science,* **137,** 835-&.

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

Trotman,L.C., Achermann,D.P., Keller,S., Straub,M., and Greber,U.F. (2003). Non-classical export of an adenovirus structural protein. *Traffic.,* **4,** 390-402.

van Bergen,B.G., van der Ley,P.A., van Driel,W., van Mansfeld,A.D., and van der Vliet,P.C. (1983). Replication of origin containing adenovirus DNA fragments that do not carry the terminal protein. *Nucleic Acids Res.,* **11,** 1975-1989.

Varga,M.J., Weibull,C., and Everitt,E. (1991). Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J. Virol.,* **65,** 6061-6070.

Visser,L., van Maarschalkerweerd,M.W., Rozijn,T.H., Wassenaar,A.D., Reemst,A.M., and Sussenbach,J.S. (1980). Viral DNA sequences in adenovirus-transformed cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.,* **44 Pt 1,** 541-550.

Vogelstein,B. and Gillespie,D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A,* **76,** 615-619.

Walters,R.W., Grunst,T., Bergelson,J.M., Finberg,R.W., Welsh,M.J., and Zabner,J. (1999). Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J. Biol. Chem.,* **274,** 10219-10226.

Walters,R.W., van't Hof,W., Yi,S.M., Schroth,M.K., Zabner,J., Crystal,R.G., and Welsh,M.J. (2001). Apical localization of the coxsackie-adenovirus receptor by glycosyl-phosphatidylinositol modification is sufficient for adenovirus-mediated gene transfer through the apical surface of human airway epithelia. *J. Virol.,* **75,** 7703-7711.

Wang,X. and Bergelson,J.M. (1999). Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J. Virol.,* **73,** 2559-2562.

Weber,J. (1976). Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. *J. Virol.,* **17,** 462-471.

Webster,A., Russell,S., Talbot,P., Russell,W.C., and Kemp,G.D. (1989). Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity. *J. Gen. Virol.,* **70 (Pt 12),** 3225-3234.

Webster,A., Leith,I.R., and Hay,R.T. (1994). Activation of Adenovirus-Coded Protease and Processing of Preterminal Protein. *Journal of Virology,* **68,** 7292-7300.

Webster,A., Leith,I.R., Nicholson,J., Hounsell,J., and Hay,R.T. (1997). Role of preterminal protein processing in adenovirus replication. *Journal of Virology,* **71,** 6381-6389.

Webster,A., Leith,I.R., and Hay,R.T. (1997). Domain organization of the adenovirus preterminal protein. *Journal of Virology,* **71,** 539-547.

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

Whyte,P., Ruley,H.E., and Harlow,E. (1988). Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.,* **62,** 257-265.

Whyte,P., Williamson,N.M., and Harlow,E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell,* **56,** 67-75.

Wickham,T.J., Mathias,P., Cheresh,D.A., and Nemerow,G.R. (1993). Integrin-Alpha-V-Beta-3 and Integrin-Alpha-V-Beta-5 Promote Adenovirus Internalization But Not Virus Attachment. *Cell,* **73,** 309-319.

Wickham,T.J. (2000). Targeting adenovirus. *Gene Ther.,* **7,** 110-114.

Yabe,Y., Taylor,G., and Trentin,J.J. (1962). Cancer Induction in Hamsters by Human Type 12 Adenovirus Effect of Age and of Virus Dose. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,* **111,** 343-&.

Yee,S.P. and Branton,P.E. (1985). Detection of cellular proteins associated with human adenovirus type 5 early region 1A polypeptides. *Virology,* **147,** 142-153.

You,Z.B., Fischer,D.C., Tong,X.W., Hasenburg,A., Aguilar-Cordova,E., and Kieback,D.G. (2001). Coxsackievirus-adenovirus receptor expression in ovarian cancer cell lines is associated with increased adenovirus transduction efficiency and transgene expression. *Cancer Gene Therapy,* **8,** 168-175.

Zock,C. and Doerfler,W. (1990). A mitigator sequence in the downstream region of the major late promoter of adenovirus type 12 DNA. *EMBO J.,* **9,** 1615-1623.

H.1 Kurzzusammenfassung

Adenovirus Typ 12 (Ad12) infiziert Hamsterzellen abortiv. Diese Eigenschaft wird als eine der Hauptfaktoren für die hohe Onkogenität des Virus in neugeborenen Syrischen Hamstern gesehen. Wir konnten bereits in früheren Arbeiten zeigen, dass die virale DNA Replikation sowie eine effiziente Transkription später Ad12 Gene in Syrischen Hamsterzellen geblockt ist. Einige der frühen Ad12 Funktionen werden in diesem System zwar transkribiert, aber auf sehr niedrigem Niveau. In der vorliegenden Arbeit demonstrieren wir, dass der Import von Ad12 DNA in die Kerne von BHK21 Hamsterzellen nicht auszureichen scheint, um Ad12 DNA Replikation zu initiieren. Quantitative Analysen des Ad12 DNA Importes in die Zellkerne zeigten nur geringfügige Mengen von Ad12 DNA Genomen in den Kernen von Ad12 infizierten Hamsterzellen im Vergleich zu den produktiv infizierten Zellsystemen, HeLa x Ad12, HeLa x Ad2 und BHK21 x Ad2. Die unzureichende Aufnahme von Ad12 könnte in einer reduzierten Expression der frühen Ad12 Gene in Ad12-infizierten BHK21 Zellen resultieren, welche nicht in der Lage ist, Ad12 DNA Replikation durchzuführen. Erst die Überexpression des menschlichen CAR (hCAR) Gens in BHK21 Zellen erlaubte eine wirkungsvolle Ad12 Aufnahme und effektiven Ad12 DNA Transport in die Kerne der Hamsterzellen. Die importierten Ad12 DNA Mengen waren vergleichbar denen der produktiven Infektionssysteme. Der erhöhte Import von Ad12 in hCAR exprimierenden BHK21 Zellen führt sogar zu mäßiger Ad12 DNA Replikation sowie zur Transkription früher und später Ad12 Gene. Die Überexpression des E1A Gens von Ad12 oder Ad2 bewirkt ebenfalls die Ad12 DNA Replikation kompletter Ad12 Genome, vermutlich hervorgerufen durch die Aktivierung der Ad12-pTP Transkription. Interessanterweise kann der Ad12 DNA Replikationsblock in BHK21 Zellen alleine durch die Überexpression des pTP-Gens überkommen werden, ohne dass dabei der Ad12 DNA Kernimport erhöht wird. Letztlich konnte aber nur in dem hCAR komplementierten Zellsystem eine Synthese des späten Ad12 Fiberproteins beobachtet werden. Die geringfügige Aufnahme von Ad12 durch Syrische Hamsterzellen spielt somit eine wichtige Schlüsselrolle bei der abortiven Interaktion von Ad12 mit Hamsterzellen. Der schlechte Import erklärt also die geringe Expression früher Ad12 Gene, die folglich zum Block der Ad12 DNA Replikation und zur nicht vorhandenen Transkription später Gene führt.

H.2 Abstract

In the adenovirus type 12 (Ad12) hamster cell system, abortive virus infection is one of the factors associated with the highly efficient oncogenesis in newborn Syrian hamsters. We have shown earlier that the replication and efficient late transcription of the Ad12 genome are blocked in Syrian hamster cells. Some of the early Ad12 functions are transcribed in these cells, although at a minimal rate. In the present study, we demonstrate that the import of Ad12 DNA into the nuclei of BHK21 hamster cells seems not to be sufficient to initiate Ad12 DNA replication. Quantitative analysis of Ad12 DNA imported into the nuclei has identified only a marginal number of Ad12 genomes in the nuclei of Ad12-infected hamster cells compared to the productive cell systems, HeLa x Ad12, HeLa x Ad2 and BHK21 x Ad2. The inefficient Ad12 uptake may result in reduced expression of the early Ad12 genes in Ad12-infected BHK21 cells which are not able to support the replication of Ad12 DNA. The overexpression of the human CAR gene in BHK21 cells allows effective Ad12 uptake and transport of Ad12 DNA into the nuclei of hamster cells at levels comparable to those in the productive infection systems. Moreover, the enhanced import of Ad12 in hCAR-expressing BHK21 cells promotes replication of Ad12 DNA at moderate levels and the transcription of early and late viral genes. The overexpression of E1A of Ad12 or Ad2 leads also to the replication of full-length Ad12 DNA genomes, likely due to the activation of the Ad12 pTP gene transcription. Remarkably, the overexpression of the Ad12 pTP gene by itself is capable of overcoming the block of Ad12 DNA replication in BHK21 cells, without enhancing the nuclear uptake of Ad12 DNA. However, only in the hCAR-complementing system, the synthesis of the late Ad12 fiber protein can be observed. Thus, the inefficient uptake of Ad12 by Syrian hamster cells is one of the important deficiencies in the abortive interaction of Ad12 with hamster cells which may explain the failure of Ad12 DNA replication and the low expression level of the early viral genes following the total block in Ad12 DNA replication and late gene transcription.

H.3 Lebenslauf

Dennis Webb

Geburtsdatum: 06.03.1975 in Berlin

Staatsbürgerschaft: deutsch

Ausbildung:

1981 – 1985 Besuch der katholischen Grundschule Düren-Echtz

1985 – 1994 Besuch des Gymnasiums am Wirteltor Düren
Abschluss: Abitur

1994 – 1995 Zivildienst in der Lebenshilfe Düren e.V.

Oktober 1995 – Mai 2001 Studium der Biologie:

- an der biologischen Fakultät der Universität zu Köln, Fachrichtung Genetik.
- Studienschwerpunkte: Virologie, Molekularbiologie, Biochemie, organische Chemie.
- Diplomarbeit im Institut für Genetik der Universität zu Köln, Abteilung med. Genetik und Virologie, Prof. Dr. med. Walter Doerfler.
  Thema: Zur Rolle des terminalen Proteins von Ad12 bei der Infektion permissiver und nicht permissiver Zellen.
  Abschluss: Diplombiologe

Mai 2001 – Mai 2004

Promotion als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Universität zu Köln, Abteilung med. Genetik und Virologie, Prof. Dr. med. Walter Doerfler.
w*issenschaftliche Projekte:*

- Untersuchungen zum Ad12 viralen Replikationsblock in BHK21 Hamsterzellen
- Entwicklung eigener Microarrays zur Analyse Ad12 (Adenovirus Typ 12) viraler Genexpression in Ad12-induzierten Hamstertumoren.
- Ad12-induzierte Hamstertumore: Analyse zellulärer Expressionsmuster.

Köln, den 4.5.2004

H.4 Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Walter Doerfler betreut worden.

Teilpublikationen:

Webb,D., Hösel, M., Schmitz,B., Auerochs,S., and Doerfler,W. (2004). Early Steps in the Interaction of Adenovirus Type 12 with Permissive Human and Nonpermissive Hamster Cells. *submitted.*

Hosel,M., Webb,D., Schroer,J., and Doerfler,W. (2003). The abortive infection of Syrian hamster cells with human adenovirus type 12. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* **272,** 415-440.

Hosel,M., Webb,D., Schroer,J., Schmitz,B., and Doerfler,W. (2001). Overexpression of the adenovirus type 12 (Ad12) pTP or E1A gene facilitates Ad12 DNA replication in nonpermissive BHK21 hamster cells. *J. Virol.*, **75,** 10041-10053.

Ich versichere, daß ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach dem besten Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obrigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln, den

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Walter Doerfler, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor. Ich bin ihm für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, sowie für die Möglichkeit der Fertigstellung dieser Arbeit im Fachgebiet der Virologie sehr dankbar. Ausserdem möchte ich mich für die vielen Kongressaufenthalte im In- und Ausland sehr bedanken, die immer ein Erfolg waren, viele Anregungen gaben und sehr viel Spass bereiteten.

Bedanken möchte ich mich sehr bei der amaxa GmbH, und dort im speziellen bei Herrn Rainer Christine, für all die finanziellen Unterstützungen während meiner Laborzeit sowie für die Kongressreisen, die ohne finanzielle Mittel nicht alle möglich gewesen wären. Vielen Dank!

Ganz herzlich möchte ich mich natürlich bei Frau Dr. Frauke Naumann bedanken, die mir nicht nur mit ihren hervorragenden beruflichen Qualitäten zur Seite stand, sondern auch niemals aufhörte, in völliger Panik über nicht funktionierende Computer und ominöse Internetangriffe, mich zum Lachen zu bringen. (widnmdp? ;))

Mein Dank gilt auch Prof. Indrikis Muiznieks für das Interesse an meiner Arbeit sowie die vielen Hilfestellungen während seiner Besuche

Bei Sabrina Auerochs bedanke ich mich herzlich für die Hilfe und Unterstützung bei der Fertigstellung der Plaqueassays. Birgit Schmitz bin ich sehr dankbar für die immer sehr gute Zusammenarbeit und vielen, vielen Mensaaufenthalte, die vor allem in der letzten Zeit ansonsten sehr einsam gewesen wären. ☺

Bei Susanne Scheffler und Petra Böhm möchte ich mich bedanken, die immer hilfreich in allen Fragestellungen waren.

Sehr grosser Danke gilt abermals Inge Bläser und Monika Schmidt. Ohne unsere beiden zuverlässigsten Frühaufsteherinnen wäre ein reibungsloser Laboralltag mit den Laborgeräten niemals möglich gewesen.

Den Jungs aus Erlangen, Andreas Dorn, Holger Brondke und Norbert Hochstein, danke ich für die schöne Laborzeit die wir zusammen hatten, zumindest was die Zeit vor dem Umzug betrifft! ☺

Allen anderen Mitarbeitern der 4. Etage, ohne jemanden speziell vergessen zu wollen, danke ich für ein angenehmes Arbeitsklima in all den Jahren.

Nicht zuletzt, sondern in ganz grossem Maße danke ich meiner Familie und Freunden.
Meiner Mutter möchte ich für die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen ganz herzlich danken, die immer zu mir gestanden hat und vieles vereinfachte.
Meinem Bruder danke ich einfach dafür, dass er mein Bruder ist, und ich hoffe, dass er in seiner neuen Heimat auch das Glück findet, dass er sich erhofft!!
Meinem Onkel Wolf habe ich ebenfalls sehr viel zu verdanken. Leider musste er uns nach langer und schwerer Krankheit dieses Jahr verlassen - Wolf, wir vermissen Dich!

Andreas Servos, der mir über die Jahre ein sehr guter Freund geworden ist, danke ich ganz herzlich für all die selbstlosen Hilfen, und für alles, was ich über Computer von ihm lernen durfte.

Der grösste Dank gilt Frau Dr. Marianna Hösel, die mir nicht nur im beruflichen Leben immer zur Seite stand und steht. Sie brachte mir das Verständnis und den Halt für das Gelingen dieser Arbeit entgegen und schenkte mir zudem die beste Tochter der Welt, Lisa-Katharina.