

**Zelluläre Transkriptionsprofile nach
Adenovirus Typ 12 Infektion oder
Tumorinduktion**

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

Andreas Dorn
aus Dormagen

Erlangen im Mai 2005

Berichterstatter: Prof. Dr. Walter Doerfler

Prof. Dr. Jens C. Brüning

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2005

Birte

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Adenoviren	2
1.2.1 Produktive Infektion	4
1.2.2 Abortive Infektion	6
1.3 Wahl der Zellsysteme und Versuche	8
1.3.1 Arraytechnik	8
1.4 Zielsetzung der Arbeit	10
2 Material	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Sonstiges Labormaterial	13
2.3 Zentrifugen	16
2.4 Enzyme	16
2.4.1 Restriktionsendonukleasen	16
2.4.2 Sonstige Enzyme	17
2.5 Größenmarker	17
2.6 Radioisotope	17
2.7 Zelllinien	17
2.8 Gewebe	18
2.9 Primer und MGB-Proben für Taqmananalysen	18
2.10 Antikörper	19
2.11 Puffer, Lösungen und Medien	19

3 Methoden	24
3.1 Zellkultur	24
3.1.1 Passage von Zellen	24
3.1.2 Zellernte	25
3.1.3 Zellen einfrieren/auftauen	25
3.2 Virusproduktion	25
3.2.1 Infektion von Zellen mit Viren	25
3.2.2 Virusernte	26
3.2.3 Virusreinigung	26
3.2.4 Viruskonzentrationsbestimmung (Partikelmenge)	27
3.2.5 Viruskonzentrationsbestimmung durch Plaqueassay (infektiöse Einheiten)	27
3.2.6 DNA-Präparation aus Virionen	28
3.3 DNA-Präparation	28
3.3.1 DNA-Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	29
3.3.2 DNA-Präzipitation	29
3.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (Freifelder und Better, 1982), (Kaiser und Hogness, 1960)	30
3.4 DNA-Analyse	30
3.4.1 Restriktionsanalyse (Nathans und Smith, 1975)	30
3.4.2 Gelelektrophorese und DNA-Visualisierung	31
3.5 RNA Analysen	31
3.5.1 RNA-Präparation	31
3.5.2 DNase-Behandlung von RNA-Proben	31
3.5.3 RNA-Präzipitation	32
3.5.4 RNA-Visualisierung	32
3.5.5 RT-PCR (Chen und Fuggle, 1993)	32
3.5.6 Quantitative Realtime PCR (Q-RT-PCR)	34
3.6 Proteinanalysen	35
3.6.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen	35
3.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976)	35

3.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.6.3.1	Gelpräparation	36
3.6.3.2	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Westerntransfer) (Burnette, 1981)	37
3.6.3.3	Proteinnachweis durch spezifische Antikörper	37
3.6.3.4	ECL-Lichtreaktion	37
3.7	Array-Technik	38
3.7.1	Lifegrid Arrays (Incyte Genomics)	39
3.7.2	Maus Arrays (Clontech)	40
3.8	Glas-cDNA-Arrays (Uppsala)	42
3.9	Detektion neusynthetisierter adenoviraler DNA	44
3.9.1	Transfektion von pEGFP-C1 in BHK mit dem Nucleofector II	44
3.9.2	FACS-Analyse der pEGFP-C1 transfizierten BHK-Zellen	45
3.9.3	Metabolisches Labeling pHCAR-transfizierter und Ad12-infizierter BHK-Zellen	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Vergleich zwischen produktiver und abortiver Infektion	46
4.1.1	Virusproduktion	46
4.1.2	Isolierung und Kontrolle der RNA	47
4.1.3	Untersuchung zur Auswirkung einer produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12: Übersichtsanalysen mit Nylonmembranen	49
4.1.4	Glasarrayuntersuchungen der produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12	60
4.1.5	Identifikation biologisch signifikanter Gene	67
4.1.6	Validierung der Microarrayexperimente durch Q-RTPCR	70
4.1.7	Analyse der Translationsaktivität regulierter Gene	71
4.2	Abortive Infektion	72
4.3	Hamsterorgane und Ad12-induzierte Tumore	75
4.3.1	Hamster- und Mausorgane: Essentielle Kontrolle	75
4.3.2	Ad12-induzierte Hamstertumoren	77
4.4	Ad12-Replikation in BHK21-Zellen?	84
5	Diskussion	88
5.1	Produktive Infektion	88

5.2	Abortive Infektion	91
5.3	Maus- und Hamsterorgane	92
5.4	Ad12-induzierte Hamstertumoren	92
5.5	Replikation von Ad12 in BHK21-Zellen?	94
6	Zusammenfassung	95
7	Literaturverzeichnis	97
8	Anhang	104
8.1	Kurzzusammenfassung	104
8.2	Abstract	105
8.3	Erklärung	106
8.4	Lebenslauf	107

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1	Beispiel für eine Amplifikationskurve im TaqMan ABI 7700.	34
Abb. 4.1	Restriktionsmuster von Ad12-DNA (BamHI, EcoRI, PstI), links und rechts davon sind DNA-Marker aufgetragen (HM, LM).	46
Abb. 4.2	RNA aufgetrennt auf einem 1 %-igen Agarosegel.	48
Abb. 4.3	Kontrollexperimente durch RT-PCR unterschiedlicher HeLa-RNA Präparationen : Scheininfektion, 24 h p.i., 32 h p.i. und 48 h p.i.).	49
Abb. 4.4	Schematische Darstellung einer Lifegridmembran der Firma Incyte.	50
Abb. 4.5	Lifegrid Array hybridisiert mit RNA aus schein-infizierten HeLa-Zellen.	51
Abb. 4.6	Lifegrid Array hybridisiert mit RNA aus HeLa-Zellen 24 Stunden nach der Infektion mit Ad12.	52
Abb. 4.7	Lifegrid Array hybridisiert mit RNA aus HeLa-Zellen 32 Stunden nach der Infektion mit Ad12.	53
Abb. 4.8	Lifegrid Array hybridisiert mit RNA aus HeLa-Zellen 48 Stunden nach der Infektion mit Ad12.	54
Abb. 4.9	Vergrößerte Darstellung der Signale des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4. Für genaue Werte siehe Tabelle 4.2.	57
Abb. 4.10	Vergrößerte Darstellung der Signale von c-Myc.	59
Abb. 4.11	Vergrößerte Darstellung der Signale des MHC Klasse I-Gens.	59
Abb. 4.12	Beispiel für die Auswertung eines Glasarrays mit Hilfe der Analysesoftware Genepix 4.0. Weißer Pfeil: Schlechter Spot; Blauer Pfeil: Signal nicht vorhanden.	60
Abb. 4.13	M-A-Plot aller Punkte, nicht normalisiert.	61
Abb. 4.14	M-A-Plot aller guten Punkte, nicht normalisiert.	62
Abb. 4.15	M-A-Plot aller Punkte, nicht normalisiert, Hintergrund abgezogen.	63
Abb. 4.16	M-A-Plot aller guten Punkte, nicht normalisiert, Hintergrund abgezogen.	64
Abb. 4.17	M-A-Plot der „gut“ markierten Punkte, Print-Tip normalisiert, Hintergrund abgezogen.	65
Abb. 4.18	M-A-Plot der guten Punkte, Hintergrund abgezogen, Print-tip normalisiert, Scale normalisiert.	66
Abb. 4.19	Beispiel für einen SAM Plot (HeLa-Ad12 32 h p.i.).	67
Abb. 4.20	Westerntransferanalyse von CTSF und CYR61 zu den angegebenen Zeitpunkten während der Infektion.	72
Abb. 4.21	Schematische Darstellung eines Mausarrays der Firma Clontech.	73
Abb. 4.22	Maus Arrays hybridisiert mit RNA aus mock-infizierten sowie mit Ad12 infizierten BHK21-Zellen.	74
Abb. 4.23	Maus Arrays hybridisiert mit cDNAs aus Leber und Milz von Maus und Hamster.	76
Abb. 4.24	Darstellung der zellulären Genexpression von drei verschiedenen Ad12-induzierten Hamstertumoren (Tumor 1: d; Tumor 2: e; Tumor 4: f) im Vergleich zur Hamsterleber (c) und den Zelllinien BHK21 (a) und T637 (b). Pfeilspitzen (in d) repräsentieren Gene, die in allen drei Tumoren ähnlich stark exprimiert werden (siehe Tabelle 4.7).	78
Abb. 4.25	Darstellung der zellulären Transkriptionsmuster dreier weiterer Ad12-induzierter Tumoren auf Maus-Cancer-Arrays. a) Tumor 5 (T5), b) Tumor 6 (T6), c) Tumor 7 (T7).	81
Abb. 4.26	FACS-Histogramme zur Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen von BHK21-Zellen mit peGFP-c1.	85

Abb. 4.27	Darstellung der radioaktiven Zerfälle pro Minute (Y-Achse) gegen die gesammelten Fraktionen (X-Achse) für HeLa-Zellen infiziert mit 25 Pfu Ad12/Zelle.	86
Abb. 4.28	Darstellung der radioaktiven Zerfälle pro Minute (Y-Achse) gegen die gesammelten Fraktionen (X-Achse) für BHK21-Zellen infiziert mit 30 Pfu Ad12/Zelle.	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Bedingungen und Teilschrittbeschreibungen einer RT-PCR.	33
Tabelle 4.1	Vergleich der Expressionsmuster von schein-infizierten HeLa-Zellen mit den Mustern der RNA aus Zellen 24 Stunden nach der Infektion mit Ad12.	55
Tabelle 4.2	Vergleich der Expressionsmuster von schein-infizierten HeLa-Zellen und 32 Stunden nach der Infektion mit Ad12.	56
Tabelle 4.3	Vergleich der Expressionsmuster von schein-infizierten HeLa-Zellen mit denen von Zellen 48 Stunden nach der Infektion mit Ad12.	58
Tabelle 4.4	Veränderungen der transkriptionellen Aktivitäten nach der Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12 im Vergleich zu schein-infizierten Zellen.	68
Tabelle 4.5	Zelluläre Genexpression, analysiert mittels Q-RT-PCR, verglichen mit Werten ermittelt durch Arrayexperimente.	70
Tabelle 4.6	Aufstellung der untersuchten Tumoren.	77
Tabelle 4.7	Darstellung der Gene, die in allen untersuchten Hamstertumoren exprimiert werden.	80
Tabelle 4.8	Zelluläre Gene, die in 6 verschiedenen Ad12-induzierten Tumoren transkribiert werden.	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad2	Adenovirus Typ 2
Ad12	Adenovirus Typ 12
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
c	Zenti-
ca	circa
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
DNase	Desoxyribonuklease
ds	double strand (engl. Doppelstrang)
eGFP	enhanced Green Fluorescence 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)
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

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Viren sind infektiöse Einheiten mit Durchmessern von 20 nm (Parvoviren) bis 300 nm (Pockenviren). Auf Grund ihrer geringen Größe sind sie filtrierbar, das heißt, daß selbst bakteriendichte Filter für sie passierbar sind. Im Laufe der Evolution haben sich die Viren an bestimmte Organismen beziehungsweise an spezielle Zellen dieser Organismen adaptiert. Die Viruspartikel, oder Virionen, bestehen aus einer Proteinhülle (Nukleokapsid), die je nach Virusart noch von einer weiteren Lipidmembran umgeben sein kann. Die Virionen selbst enthalten das virale Erbgut, welches aus DNA, RNA oder beidem bestehen kann. Die Vermehrung von Viren verläuft nicht über die Zellteilung, wie es bei allen anderen Organismen der Fall ist. Viren reproduzieren sich in einem eigenen Zyklus, benötigen aber einige Funktionen und Bestandteile der Wirtszellen. Dort beginnen sie, ihr Genom zu replizieren und die Komponenten für neue infektiöse Partikel zu synthetisieren. Da Viren auf die Zellmaschinerie angewiesen sind, kann man sie auch als intrazelluläre Parasiten bezeichnen.

Viren sind in der Lage einen Teil der Zellfunktionen zu ihren Gunsten abzuändern, um für ihre Vermehrung optimale Bedingungen zu schaffen. Abhängig vom Virustyp und der zu infizierenden Wirtszelle kann die Infektion für beide Seiten unterschiedliche Folgen haben:

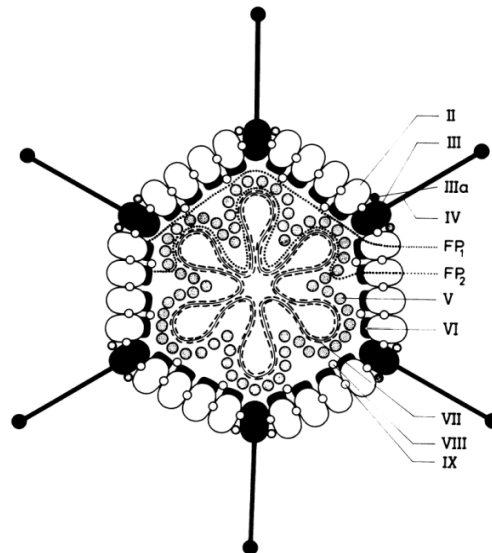
1. Die Wirtszelle wird durch die Virusinfektion zerstört und stirbt (produktive Infektion).
2. Die Wirtszelle überlebt, produziert aber kontinuierlich Virionen und ist damit chronisch infiziert (semipermissives System).
3. Die Wirtszelle überlebt und das Virusgenom bleibt im latenten Zustand erhalten, ohne daß infektiöse Partikel entstehen (latente Infektion).
4. Die Wirtszelle wird durch bestimmte Funktionen des Virus immortalisiert und erhält die Fähigkeit zur kontinuierlichen Teilung, wodurch es zur malignen Entartung der Zelle (Tumorzelle) kommen kann (abortive Infektion).

In dieser Arbeit werden Probleme der verschiedenen Arten von Virusinfektionen auf Wirtszellebene untersucht.

1.2 Adenoviren

Im Jahre 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 bevorzugt menschliche Zellen sowie Zellen vieler anderer Säugetiere und Vögel. Bis heute sind mehr als 125 serologische Adenovirussubtypen identifiziert worden, von denen mehr als 50 Adenovirussubtypen in der Lage sind, menschliche Zellen zu infizieren (Wigand et al., 1982; de Jong et al., 1984). Die zuletzt genannten Subtypen verursachen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, infizieren aber auch den Gastrointestinalbereich und die Bindehaut des Auges. Zudem sind einige Subtypen in der Lage, Zellen in Kultur zu transformieren (Pope und Rowe, 1964) oder in neugeborenen Hamstern Tumorbildung zu induzieren (Huebner et al., 1962; Trentin et al., 1962). Dieser Beobachtung zufolge werden Adenoviren je nach ihrem onkogenen Potential auch in die Gruppen A-F eingeteilt (M. Green, 1969; Wadell et al., 1980; Wigand et al., 1982). Adenovirus Typ 12 (Ad12) gehört zur Gruppe A mit einem hohen onkogenen Potential. Die Arbeiten dieser Wissenschaftler gaben 1962 die ersten Hinweise darauf, daß es auch humanpathogene Viren mit karzinogenem Potential gibt. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Adenovirusinfektionen und menschlichen Tumoren wurde jedoch bisher nicht festgestellt (Green et al., 1979; Mackey et al., 1979; Wold et al., 1979; Mende et al., 2004).

Modell eines Adenovirus



Vereinfachte Übersicht eines Adenoviruspartikels. Sie stellt eine Zusammenfassung der wichtigsten Proteinkomponenten und der viralen DNA dar (Brown et al., 1975).

Adenoviren haben einen Durchmesser von 80 bis 100 nm. Ihre Capside besitzen eine ikosaedrische Struktur mit 20 Seitenflächen und zwölf Ecken. Sie sind nicht von einer weiteren Lipidmembran umgeben. Sie bestehen aus 252 Capsomeren, 240 Hexonen und 12 Pentonen, welche die Ecken des Ikosaeders bilden. Die Pentone bestehen aus der Pentonbasis und einem Fiberproteinanteil. Das Genom der Adenoviren besteht je nach Virussubtyp aus doppelsträngiger, linearer DNA mit einer Länge von 32 bis 36 Kilobasenpaaren (kbp). Das hier verwendete Ad12 hat eine Genomlänge von 34.125 bp (Sprengel et al., 1994). An die beiden 5'-Enden des Genoms ist ein terminales Proteinmolekül mit einer Größe von 55 kDa kovalent gebunden. Außerdem sind zwei Proteinkomponenten mit der DNA des Virus nicht kovalent komplexiert. Zum einen das Protein VII, welches in über 1.000 Kopien im Viruspartikel vorliegt und über die gesamte Länge des Genoms verteilt mit diesem assoziiert ist. Zum anderen das Protein V, das für die Faltung der DNA im Caspid verantwortlich ist und histonähnliche Funktionen besitzt (Philipson und Pettersson, 1973). Diese Proteine sind neben vielen anderen Proteinen drei der auffälligsten Proteine in Adenoviren.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Infektionsarten der Adenoviren insbesondere von Ad12 vorgestellt.

1.2.1 Produktive Infektion

In produktiv infizierten menschlichen Zellen wird die DNA des Adenovirus vollständig repliziert, es werden neue Virionen gebildet und freigesetzt. Dazu schleust das Virus sein Genom in den Kern der Wirtszelle ein, wo virale mRNA synthetisiert wird. Nach dem Transport in das Cytoplasma translatieren Wirtszellenzyme die mRNAs in Proteine. Diese Proteine werden anschließend in den Zellkern gebracht, wo dann alle weiteren Schritte der viralen Replikation bis zum Zusammensetzen neuer infektiöser Viruspartikel stattfinden.

Der virale Infektionszyklus verläuft in einem zeitlich streng kontrollierten Rahmen und kann in eine frühe und eine späte Infektionsphase gegliedert werden. Zwischen diesen beiden Phasen liegt der Start der DNA Replikation. Somit beginnt die Infektion mit der Transkription und Expression der frühen Gene, welche absolut notwendig für den weiteren Verlauf der Infektion sind. Nachdem die DNA-Replikation begonnen hat, wird schließlich der MLP (**M**ajor **L**ate **P**romoter) aktiviert, der für die Transkription aller späten Gene verantwortlich ist. Nach Synthese der Strukturproteine dieser späten Gene beginnt letztlich der Zusammenbau der neuen Virionen.

Wie lange ein produktiver Infektionszyklus von Ad12 dauert, ist unklar. Für eine optimale Virusausbeute und aufgrund des starken cytopathischen Effekts (CPE), hat man sich entschieden, die infizierten Zellen 72 h nach ihrer Infektion (h p.i.) zu ernten. Allerdings hat man auch 90 h p.i. noch Zellen mit intakten Zellkernen gefunden, die eine große Anzahl von Virionen enthielten (Dunker und Brown, 1979). Wahrscheinlich durchläuft das Virus in diesem Zeitraum mehrere Replikationszyklen. Der Zyklus beginnt mit der Adsorption des Virus an die Zelle. Dies geschieht mit Hilfe des Fiberproteins, welches an den CAR-Rezeptor (**C**oxsackievirus und **A**denovirus **R**ezeptor) bindet. Bereits 1968 wurde entdeckt, daß die „Knob“-Domäne des Fiberproteins mit dem für den Eintritt notwendigen Rezeptor interagiert (Philipson et al., 1968). 1976 fanden Lonberg-Holm und Kollegen heraus, daß sich sowohl Cocksackieviren der Gruppe B als auch Adenoviren der Subgruppe C den gleichen Rezeptor teilen (Lonberg-Holm et al., 1976). Neben der primären Interaktion zwischen CAR und dem Fiberprotein ist, wie bei den meisten Viren, eine Interaktion mit einem sekundären Rezeptor für eine produktive Internalisierung nötig. Im Fall von Ad12 interagiert die Penton Base, ein weiteres Hüllprotein, mit zwei unterschiedlichen zellulären Integrinen ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) (Wickham et al., 1993). Durch einen endozytotischen Prozess gelangt das Virus in das Zellinnere. Dort löst sich sowohl das Capsid als auch das Endosom auf und das Virusgenom kann in den Zellkern gelangen. Allerdings ist bis heute nicht geklärt, ob die Endozytose der

einzigste Weg von Adenoviren ist, in eine Zelle zu penetrieren. Es wird jedoch vermutet, daß mögliche Alternativen meist nicht infektiös enden bzw. nur dann, wenn der oben erwähnte endocytotische Prozess beteiligt ist (Meier und Greber, 2004). Nun gelangt das Genom in den Zellkern und zwischen 6 und 8 h p.i. werden bereits die ersten adenoviralen Gene transkribiert (Dissertation Dr. Dennis Webb, 2004). Hierbei handelt es sich um die Gene der E1-Region. Sie dienen als Aktivator aller nachgeschalteten Promotoren, die für eine effektive Infektion nötig sind. Nach circa 14 -16 Stunden beginnt die DNA-Replikation des Virus im Zellkern. Der MLP wird aktiviert und die strukturellen Bestandteile des Virus werden mit Hilfe der Wirtszellmaschinerie produziert. Dabei spielt das E1B-55kDa-Protein, ein weiteres frühes Gen von Ad12, eine wichtige Rolle. Neben der wichtigen Funktion einer effizienten DNA-Replikation ist das Protein auch für den Transport viraler mRNAs in das Cytoplasma der Wirtszelle verantwortlich. Gleichzeitig blockiert E1B-55kDa zusammen mit E4 orf6 den Transport zellulärer mRNAs (Stillman, 1986) aus dem Zellkern. Anschließend werden bis zu 10^4 neue Virionen im Zellkern synthetisiert und akkumulieren dort. Die Freisetzung neu gebildeter Ad12-Virionen ist noch nicht verstanden. Man vermutet, daß sie entweder passiv die Wirtszelle verlassen, oder einem gerichteten Transport aus der Zelle unterliegen (Brüggemann et al., 1985). Allerdings fand man heraus, daß extrazelluläre Ad12-Virionen bis zu 10 mal infektiöser sind als intrazelluläre Partikel. Andere Unterschiede zwischen beiden Virusspezies fand man nicht (Brüggemann et al., 1985).

Eine weitere Fähigkeit von Adenoviren besteht darin, der zellulären Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Die Viren sind in der Lage, den für die Antigenpräsentation verantwortlichen MHC-I (englisch: major histocompatibility complex I) herunter zu regulieren. Verantwortlich dafür ist die E3-Region. Im speziellen bindet ein 19 kDa-Protein im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums an neu synthetisierte MHC-I-Moleküle und verhindert so den Transport dieser Moleküle an die Zelloberfläche (Wold et al., 1999). Auf diese Art besitzen Adenoviren eine posttranslationale Kontrolle über die antigenpräsentierenden Moleküle der Wirtszelle. Ad12 jedoch besitzt kein solches 19 kDa-Protein (Sprengel et al., 1994). Wie löst nun Ad12 das Problem der Immunantwort des Wirtes? Im Gegensatz zu anderen Subtypen reprimiert Ad12 MHC-I auf der transkriptionellen Ebene (Logeat et al., 1991; Ge et al., 1992, Proffitt et al., 1994). Auch hier spielt die E1-Region eine wichtige Rolle. E1A Proteine binden an drei verschiedene regulatorische Regionen, die bis zu 1.800 bp upstream vom Transkriptionsstart entfernt liegen. Somit wird die Expression eines entscheidenden Wirtszellproteins gehemmt und die produktive Infektion kann weiterhin fortschreiten.

1.2.2 Abortive Infektion

Bei dieser Art der Infektion werden aus einer Virus-infizierten Zelle keine neusynthetisierten und infektiösen Partikel freigesetzt (Strohl et al., 1966). Die Anfangsphase einer abortiven Infektion verläuft in der Regel wie die einer produktiven Infektion. Im Verlauf der Infektion von Zellen des Syrischen Hamsters (*Mesocricetus auratus*) mit Ad12 findet zunächst die Adsorption des Virus an die Zelle statt. Dann folgt vermutlich die rezeptorvermittelte Endozytose, die jedoch bisher nicht genauer untersucht wurde, und der Transport der DNA in den Zellkern. Dort beginnt die Expression einiger früher Gene. Der Infektionsverlauf wird an diesem Punkt aber unterbrochen und kann nicht in die Phase der DNA-Replikation übergehen. Die Ad12-DNA-Synthese findet nicht statt und die Expression der späten Gene bleibt ebenfalls aus (Doerfler, 1968, 1969, 1970; Doerfler und Lundholm, 1970; Fanning und Doerfler, 1978). Im Gegensatz dazu infizieren Ad2 und Ad5 BHK21-Zellen produktiv. Auch die Tatsache, daß Adenovirus Typ 2 (Ad2) und Adenovirus Typ 5 (Ad5) sich in menschlichen Zellen effizienter und schneller replizieren als Ad12, läßt ahnen, daß Ad12 einige Defekte hat bzw. einige Funktionen nicht besitzt, um BHK21-Zellen produktiv zu infizieren. Der Block der Ad12-Infektion von BHK21-Zellen liegt nicht an einer definierten Stelle. Vielmehr handelt es sich um ein komplexes System aus mehreren Blockierungspunkten während der Infektion. So konnte festgestellt werden, daß nach einer Infektion von BHK21-Zellen mit Ad12 zu wenig Virusgenome in den Zellkern gelangen. Die Transfektion des menschlichen CAR-Gens (hCAR) verbessert die Aufnahme Ad12-DNA in den Kern der BHK21-Zellen deutlich (Dissertation Dr. Dennis Webb, 2004). Die Blockade der Ad12-DNA-Replikation kann in begrenztem Umfang ebenfalls überwunden werden. Durch eine Überexpression der E1A-Region sowie des präterminalen Proteins (pTP) und anschließender Infektion von BHK21-Zellen mit Ad12 konnte DNA-Replikation nachgewiesen werden (Hösel et al., 2001). Sogar späte mRNAs wurden transkribiert, jedoch wurde keinerlei Translationsaktivität dieser mRNAs festgestellt (Klimkait und Doerfler, 1985, 1987; Schiedner et al., 1994). Hier scheint der nächste Punkt der Blockade zu liegen. Frühe Gene werden sowohl transkribiert als auch translatiert, wohingegen späte Gene nur schwach transkribiert werden. Ein weiteres Merkmal der abortiven Infektion besteht darin, daß das Virusgenom während der Infektion in manchen Fällen in das Wirtszellgenom integriert wird. So gibt es verschiedene Hamsterzelllinien (T637, TR12, TR3 u.a.), die unterschiedlich viele Kopien von Ad12-Genomen stabil integriert haben. Es besteht die Möglichkeit, Nagetierzellen in vitro mit Ad12 zu transformieren.

Hier läßt sich ein weiteres Charakteristikum von Ad12 erwähnen: das karzinogene

Potential. Injiziert man mehr als $4,5 \times 10^6$ PFU (**p**laque **f**orming **u**nits) menschliches Ad12 subcutan in neugeborene Syrische Hamster, so entsteht an der Injektionsstelle ein Tumor in circa 70 % der Hamster innerhalb von 30 bis 50 Tagen (Trentin et al., 1962; Kuhlmann et al., 1982; Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997; Hohlweg et al., 2003). Wird jedoch intramuskulär injiziert, entsteht die große Mehrzahl der Tumoren nicht am Injektionsort, sondern in der Peritonealhöhle und der Leber. Injiziert man $4,5 \times 10^4$ oder weniger PFU, entwickeln sich keine Tumoren, das heißt das Tier kann sich gegen diese Viruslast wehren. Voraussetzung dieser malignen Tumorbildung ist die abortive Infektion von Ad12 bei Hamstern. Bei den Tumoren handelt es sich um Homer-Wright Rosettenstrukturen von primitiven neuroektodermalen Tumoren. Desweiteren ist zu sagen, daß in jedem Tumor ein individuelles Muster von integrierten Ad12-Genomen gefunden wurde. Die Muster unterscheiden sich in Menge und Ort der Integration. Nimmt man diese Tumorzellen in Kultur, können manche Zellen nach einigen Passagen graduell die integrierte adenovirale DNA wieder verlieren. Dennoch waren die Zellen nach Reinjektion in neugeborene Hamster weiterhin in der Lage, Tumore zu induzieren (Kuhlmann et al., 1982; Pfeffer et al., 1999). Diese Entdeckung bedeutete, daß die adenovirale Integration in das Wirtszellgenom keine Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung des transformierten Status der Zelle ist.

Die wichtigste Region, die für die onkogene Transformation der Zellen verantwortlich ist, ist die E1-Region. Hierbei kommt es auf das Zusammenspiel von Genprodukten aus den Regionen E1A und E1B an. Aus der einheitlichen Vorläufer-RNA des E1A-Gens entstehen durch differenzielles Splicen insgesamt fünf verschiedene mRNA-Spezies (9S - 13S). In der frühen Phase der Infektion werden hauptsächlich die beiden großen 12S und 13S-RNAs gebildet. In der späten Phase der Infektion akkumulieren jedoch die drei kürzeren Varianten. Bisher wurden jedoch keine definitiven Funktionen für diese mRNAs erkannt. (Endter und Dobner, 2004). Es reicht aus die E1-Region zu transfizieren, um einen immortalisierten Status der Nagetierzelle zu erreichen oder auch Tumore in Nagetieren zu induzieren (Graham et al., 1984; Williams et al., 1995). Die Vorläufer-RNA des E1B-Gens wird ebenfalls durch alternatives Splicen in mehrere mRNA-Spezies unterteilt. Neben den bekannten Genprodukten E1B-19kDa sowie E1B-55kDa wurden jedoch zwei weitere mRNAs beschrieben, die für zwei, den eben erwähnten Proteinen ähnliche Produkte kodieren. Auch für diese Proteine wurde bisher keine nähere Funktion gefunden, weder während der Infektion noch bei Transformationsereignissen (Virtanen und Pettersson, 1985).

Es wird interessant sein zu sehen, wie sich sowohl die produktive als auch die abortive Infektion von verschiedenen Zelllinien mit Ad12 bzw. Ad12-induzierte Tumore auf die

zellulären Transkriptionsmuster auswirken kann.

1.3 Wahl der Zellsysteme und Versuche

In dieser Arbeit sollen die Expressionsmuster der zellulären Gene bei einer Infektion mit Ad12 in unterschiedlichen Zelllinien und Geweben untersucht werden. Zur Untersuchung der produktiven Infektion mit Ad12 dienen HeLa-Zellen, in denen sich das Virus sehr effektiv vermehrt. Um die Expressionsmuster zellulärer Gene während einer abortiven Infektion zu untersuchen, wurde die Hamsterzelllinie BHK21 (Baby Hamster Kidney) herangezogen. Wie schon erwähnt, ist das Virus nicht in der Lage, diese Zellen produktiv zu infizieren. Desweiteren wurden drei Ad12 - induzierte Tumoren auf die Expression zellulärer Gene hin untersucht. Als Referenzzellen dienten hier zum einen die transformierte BHK21-Zelllinie T637 sowie unterschiedliche Gewebe aus dem Hamster selbst (Leber und Milz).

1.3.1 Arraytechnik

Bisher konnte man mit Hilfe des Northern- sowie des Westerntransfers immer nur einzelne Gene auf ihre Expression hin untersuchen. Einerseits ist dies ein sehr aufwendiges Verfahren, andererseits ungeeignet, um sich einen Überblick über die Expression von vielen Genen innerhalb einer Zelle zu verschaffen. So untersuchten bereits 1992 Rosahl und Doerfler die unterschiedlichen Expressionsmuster zellulärer Gene verschiedener Zelllinien. Zu den Zelllinien gehörten Ad2-infizierte KB-Zellen, Ad5-transformierte menschliche Zellen (293), sowie verschiedene Ad2- beziehungsweise Ad12-transformierte Hamsterzelllinien. Dazu benutzten sie 40 verschiedene zelluläre Gene oder Gensegmente als Hybridisierungsproben gegen die jeweiligen isolierten RNAs. Bei fünf dieser 40 Sonden stellten sie Unterschiede in der Expression in den einzelnen Zelllinien fest. Im Jahre 1994 fanden Proffit et al., daß die E1A-Region von Ad12 einen negativen regulatorischen Effekt auf den Promotor der Klasse I-Gene des MHC-Komplexes besitzt (englisch: Major histocompatibility complex). Bestätigt wurden diese Resultate durch Huvent und Mitarbeiter (Huvent et al., 1997), die mit Hilfe verschiedener Transfektionsexperimente herausfanden, daß das Produkt der 13S mRNA des E1A-Komplexes für diese Reprimierung verantwortlich ist. Diesen Effekt findet man allerdings nur in Ad12-transformierten Zellen, in Ad2- oder Ad5-

transformierten Zellen ist die Expression der MHC-I-Gene unverändert. Es wird vermutet, daß diese negative Regulation ein Grund dafür ist, daß Ad12-transformierte Zellen der Immunabwehr des Wirtes entkommen können und so ihr onkogenes Potential nutzen. Ebenfalls durch Transfektionen fanden Timmers und Mitarbeiter im Jahr 1988 heraus, daß die Produkte der E1A-Region für die reduzierte Expression des Gens c-myc, welches an der Zellproliferation beteiligt ist, verantwortlich sind. Alle diese Untersuchungen konzentrieren sich nur auf ein beziehungsweise wenige Gene. Wenn man nun jedoch einen größeren Überblick über die Veränderungen der zellulären Genexpression bekommen will, kann man sich die Arraytechnik zu Nutze machen.

Die hier verwendeten Arraymembranen beinhalten eine große Anzahl von Genen: 8.400 Gene auf den humanen Arraymembranen (Incyte Genomics) und 1.176 Gene auf den Mausarrays (Clontech). Auf die verwendeten Glasarrays wurden 7.500 bekannte menschliche Gene aufgetragen. Bereits 1995 demonstrierten Schena und Mitarbeiter die Nutzung dieser Technik, als sie innerhalb eines Experimentes die RNA zweier unterschiedlich behandelter Arabidopsispflanzen untersuchten. Sie fanden Unterschiede in der Expression von 45 Genen. Diese Ergebnisse müssen mittels Northerntransfer oder quantitativer Real time PCR bestätigt werden, jedoch hat man bei Anwendung der Array Technik den Vorteil, daß man weiß, auf welche Gene man sich konzentrieren muß. Insgesamt kann man sagen, daß in dieser Technik großes Potenzial liegt. Ein anderes Beispiel, wo man diese Technik genutzt hat, ist der Vergleich von Ad5-transformierten und Ad12-transformierten Zellen (Vertegaal et al., 2000). Hier fand man, daß neben den niedrigen Expressionsleveln der MHC-I-Gene auch z.B. das Chaperonprotein Tapasin in Ad12-transformierten BRK-Zellen (englisch: Baby rat kidney) weniger exprimiert wird als in Ad5-transformierten BRK-Zellen. Im Jahr 2003 untersuchten Zhao und Kollegen (Zhao et al., 2003) die Auswirkungen der produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad2. Ad2 repliziert sich im Vergleich zu Ad12 mit einem ca. 24 h dauernden Zyklus wesentlich schneller. In dieser Arbeit konzentrierten sie sich auf einen frühen Zeitpunkt der Infektion (6 h p.i.). Sie fanden heraus, daß im Vergleich zu mock-infizierten Zellen 76 zelluläre Gene unterschiedlich transkribiert werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der Arraytechnik ist die Medizin. Hier werden die Expressionsmuster von Tumorgewebe und umliegendem gesundem Gewebe untersucht. Diese Analysen können hilfreich sein für Untersuchungen, die sich mit der Tumorentstehung beschäftigen, um festzustellen, welche Gene für die Tumorbildung verantwortlich sein könnten. Andererseits kann man diese Ergebnisse auch für die Erforschung neuer Medikamente nutzen, um zum Beispiel weiteres Wachstum des

Tumors zu verhindern. Allerdings sollte man sich auch nicht zu sehr auf diese Technik verlassen. So gibt es viele Studien über unterschiedliche Krebsarten und deren Behandlungsmöglichkeiten, die anhand der Expressionsprofile der Patienten versuchen, bestimmte Markergene zu identifizieren. Basierend auf diesen Markergenen soll es dann in Zukunft möglich sein zu entscheiden, ob ein Patient ein bestimmtes Medikament oder eine andere Art der Behandlung bekommt oder nicht. Es sollte dabei immer bedacht werden, daß alle Menschen individuelle Transkriptionsprofile bestimmter Gene besitzt. Die Behandlung einer schweren Krankheit sollte nicht nur von der Expression von zwei oder drei bestimmten Genen abhängen. Andere Studien beschäftigen sich mit der Prognose des Ausgangs einer Krebserkrankung anhand der Transkriptionsprofile der Patienten (Michiels et al., 2005). Allerdings sind die entstandenen Modelle sehr fehleranfällig, sodaß solche Prognosen sehr vorsichtig behandelt werden sollten.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen mit Hilfe der Arraytechnik die Expressionsmuster verschiedener Zelllinien untersucht werden. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der Untersuchung der produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12. Für diese Experimente werden zum einen die Nylonmembranen der Firma Incyte Genomics, die 8.400 zelluläre Gene enthalten, benutzt. Für eine genauere Quantifizierung werden Glasarrays benutzt, auf denen jeweils 7.500 bekannte menschliche Gene aufgetragen werden. Desweiteren werden die durch die Expressionsuntersuchungen gewonnenen Ergebnisse auf RNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR überprüft. Auf Proteinebene werden Westerntransferanalysen durchgeführt, um einen eventuellen Unterschied zwischen Transkription und Translation der zellulären Gene zu erfassen. Um das abortive System zu studieren, werden BHK21-Zellen mit Ad12 infiziert und anschließend untersucht. In diesem Bereich wird zusätzlich versucht, den Block während der Replikation von Ad12 in BHK-Zellen aufzuheben, indem der humane Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (hCAR) transfiziert wird. Die Expressionsstudien erstrecken sich weiterhin auf die Ad12-transformierte Zelllinie T637, die ungefähr 15 Kopien des Ad12-Genoms im zellulären Genom integriert enthält. Abschließend werden drei Ad12-induzierte Hamstertumore unterschiedlicher Größe und aus zwei verschiedenen Tieren auf ihr Expressionsmuster hin untersucht. Hierbei ist zu beachten, ob und wie sich diese Expressionsmuster von der der Ad12-transformierten Zelllinie T637 unterscheiden, da in den Tumoren ebenfalls unterschiedlich viele Genome von Ad12 in das Wirtszellgenom integriert sind. Als

Vergleichsgewebe zu den Tumoren werden sowohl Leber als auch Milz des Hamsters herangezogen. Diese Experimente werden auf den Nylonmembranen der Firma Clontech durchgeführt. Dies sind Membranen, auf denen sich 1.176 Mausgene befinden. Es gibt keine „Hamsterarrays“, die man für diese Zwecke gebrauchen müsste. Um diese Mausmembranen für Hamster-RNA zu benutzen, werden zunächst Vergleiche zwischen einigen Geweben der Maus (Leber und Milz) und den eben genannten Hamstergeweben angestellt. Diese Untersuchung sowie Analysen der Sequenzhomologien zwischen Maus und Hamster (zwischen 86 und 95%) führten dazu, daß diese Membranen auch für Hamstergewebe geeignet waren.

2 Material

2.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	FMC, Rockland, ME, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate	Promega, Madison, WI, USA
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS, ultrar-ein)	Merck, Darmstadt
DTT	Merck, Darmstadt
ECL-Kit	Amersham, Piscataway, NJ, USA
EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Formaldehyd (37%)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Glycerin, 87%	Merck, Darmstadt
Heringsspermien-DNA Typ XIV	Sigma, St. Louis, MO, USA
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natrium-di-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Roth, Karlsruhe
Neutral-Rot	Sigma, St. Louis, MO, USA
Phenol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend)	Merck, Darmstadt
SeaPlaque Agarose für Plaqueassays	FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA
Sephadex G-50	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Stickstoff, verflüssigt	Linde, Höllriegelskreuth
T-PER	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Xylencyanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Ziegenserum	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.2 Sonstiges Labormaterial

Abbildplatten	Fuji, Tokio, Japan
Aquariumfilterwatte	Weltweitprodukt, Holm bei Hamburg
Bakterieninkubator	Memmert, Schwabach
Bakterienschüttler	Infors, Bottmingen, Schweiz
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blaukappröhrchen, 50ml	Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA
CCD-Kamera Fujifilm LAS-1000	Fuji, Tokio, Japan
Deckgläser	AL, Mainz
Dialyseschläuche	Medicell, London, Großbritannien

DNA-Gelextraktionskit Quick	Qiagen, Hilden
Einwegkanülen	Terumo, Leuven, Belgien
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
FACS-Gerät FACSCalibur	Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA
Frischhaltefolie	Melitta, München
Geneamp PCR System 2400	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Genepix 4000B scanner	Axon Instruments, Union City, CA, USA
Genepix 4.0 Analysesoftware	Axon Instruments, Union City, CA, USA
Glaswaren	Schott, Mainz; Brand, Wertheim
Hybridisierungsinkubator OV10	Biometra, Göttingen
Hybridisierungsröhren	Bachofer, Reutlingen
Inkubator Cytoperm Tyo 8080	Heraeus Sepatech, Hanau
Magnetrührer	Janke und Kunkel, Staufen
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Minigelkammer DNA-Pocketblock	Biozym, Hess, Oldenburg
Minigelkammer Protean 2	Biorad, Hercules, CA, USA
Netzgerät GPS 200/400	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Netzgerät Modell 200/2.0	Biorad, Hercules, CA, USA
Netzgerät PowerPac 3000	Biorad, Hercules, CA, USA
NucleoSpin RNA Isolation Kit	Macherey & Nagel, Düren
Nylonmembran	Roche, Mannheim
Objektträger Super Frost	Menzel-Gläser, Mainz
Parafilm "M"	American Can Comp., Greenwich, CT, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Diagnostik GmbH, Hess, Oldenburg
pH-Meter Digi 520	WTW, Weilheim
Pipetten	
- 0-10 µl	Eppendorf, Hamburg
- 2-20 µl	Eppendorf, Hamburg

- 20-200 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
- 200-1000 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences, Chur, Schweiz
PVDF-Membranen	Amersham, Piscataway, NJ, USA
Quarzglasküvette 50 µl	Greiner, Frickenhausen
Radiomembran-detektor BAS 2000	Fuji, Tokio, Japan
Reaktionsgefäße	
- 0,5ml, 1,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Rotkappröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilmkassetten	Dr. Goos, Heidelberg
Access RT-PCR Kit	Promega, Madison, WI, USA
Sonifikator Branson 450	Branson Sonic Power, Danbury, CT, USA
Sterilbank Antair BSK 4	Anthos Mikrosysteme, Köln
Swing-out Rotor SW60	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Szintillationszähler LS 1801	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Szintillationszähler Beta-Counter 1450	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
Tiefkühltruhe Herafreeze	Heraeus Sepatech, Hanau
Transfektionsgerät Nucleofector II	Amaxa, Köln
Transfektionsküvetten und -pipetten	Amaxa, Köln
Transilluminator E.A.S.Y. RH	Herolab, Wiesloch
Ultrazentrifugenröhrchen, SW60	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Videoprinter CP770DW	Mitsubishi, Tokio, Japan
Vortex Genie 2	Bender&Holbein, Zürich, Schweiz
Wasserbäder	GFL, Burgwedel
Wasserfilteranlage Milli-QUF	Millipore, Bedford, MA, USA

Westerntransferkammer Mini-Transblot	Biorad, Hercules, CA, USA
Whatmanpapier	Dr. Kleef, Bonn
Zellkulturflaschen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturinkubator Steri-Cult 200	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifugenbecher, PPCO 1000 ml	Nalgene, Rochester, NY, USA

2.3 Zentrifugen

Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Hanau
Biofuge pico Tischzentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Hanau
Rotina 48R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Sorvall RC5B Plus	Kendro, Ashville, NC, USA
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Vacuum concentrator	Bachofer, Reutlingen

2.4 Enzyme

2.4.1 Restriktionsendonukleasen

Die hier genannten Enzyme wurden mit den empfohlenen 10x-Puffern verwendet.

<i>Bam HI</i>	Roche, Mannheim
<i>Eco RI</i>	Roche, Mannheim
<i>PstI</i>	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen

2.4.2 Sonstige Enzyme

DNase RQ1	Promega, Madison, WI, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNase H	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.5 Größenmarker

Generuler DNA Leitermix	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen
λ -DNA / <i>Eco130I</i> (<i>Styl</i>) / <i>Mlu I</i>	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen
Low DNA Marker	Life Technologies, Paisley, Schottland
Prestained Protein Ladder 10 - 180kD	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen

2.6 Radioisotope

Desoxycytosin-5'-[$\alpha^{32}\text{P}$]-triphosphat	NEN, DuPont, MA, USA
Desoxycytosin-5'-[$\alpha^{33}\text{P}$]-triphosphat	NEN, DuPont, MA, USA
Orthophosphat ^{33}P	Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden
[^3H]-markierte Aminosäuremischung	Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden

2.7 Zelllinien

A549: menschliche Zellen eines Lungenkarzinoms	American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, USA; CCL-185 (Giard <i>et al.</i> , 1973)
--	--

BHK21: Nierenzellen neugeborener Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, USA; CCL-10 (Macpherson und Stoker, 1964)
HeLa: menschliche Zellen eines Zervixkarzinoms	American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, USA; CCL-2 (Gey <i>et al.</i> , 1952)

2.8 Gewebe

Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	Charles River, Sulzfeld
- Leber	
- Milz	
- Ad12-induzierte Tumoren	

2.9 Primer und MGB-Proben für Taqmananalysen

Die verwendeten Primer sind bei der Firma MWG-Biotech, Ebersberg gekauft worden.

Primerpaar für das β -Aktin:

Vorwärtsprimer: 5'-ATG GAT GAT GAT ATC GCC GC-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GTG TGG TGC CAG ATT TTC TCC-3'

Für die Taqmananalysen bestimmter menschlicher Gene wurden sogenannte **Minor Groove Binder**-Proben (MGB) verwendet. In diesen Proben sind die beiden Primer und eine spezielle an Fluoreszenzmoleküle gekoppelte Probe zusammengefasst.

ACTB	NM_001101
ANPEP	NM_001150
ATF2	NM_001880
CD83	NM_004233
c-MYC	NM_002467

CTSF	NM_003793
CYR61	NM_001554
FUBP1	NM_003902
G1P2	NM_005101
IFIT1	NM_001548
IL-6	NM_000600
JUNB	NM_002229
MCC	NM_002387

2.10 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotchnology, Santa Cruz, CA, USA erworben.

CTSF	sc-13987
CYR61	sc-13100

2.11 Puffer, Lösungen und Medien

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
10% SDS	10% SDS in ddH ₂ O (w/v)
Blocking-Lösung für Westerntransfer	0,2% Tween, 5% Milchpulver in PBS-d

Cäsiumchloridlösung	0,5 g CsCl/ml in 20 mM Tris-HCl, pH 8,0
Chloroform-Isoamylalkoholgemisch	Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1
Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate	10 mM in H ₂ O
DNA-Ladepuffer	50% Glycerin 1% SDS 0,1 M EDTA pH 7,8 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanol
Dulbecco Medium	nach Bablanian et al., 1965 + 10% FCS; Lagerung bei +4°C
Ethidiumbromidlösung	2 µg/ml in H ₂ O
FACS-Puffer	5% FCS 0,01% NaN ₃ in PBS-d
Heringspermien DNA	10 mg/ml in ddH ₂ O; Lagerung bei +4°C
Hybridisierungslösung für Southerntransfer	0,5 M NaH ₂ PO ₄ 0,1 M EDTA 7% SDS
Natriumacetatlösung	für DNA: 3 M NaAc pH 5,0 für RNA: 2 M NaAc pH 4,3

PBS (Dulbecco und Vogt, 1954)	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂ pH auf 7,4 einstellen PBS ohne CaCl ₂ und MgCl ₂
PBS-d	PBS ohne CaCl ₂ und MgCl ₂
Phenol zur RNA Reinigung	0,1% 8-Hydroxyquinolin gesättigt mit 0,1 M Tris-HCl pH 4,3
Plaquemedium	9 ml 2 x DMEM 1 ml FCS 10 ml 1,2% Seaplaque Agarose gelöst in ddH ₂ O
Plaquemedium zur Färbung	9 ml 2 x DMEM 1 ml FCS 10 ml 1,2% Seaplaque Agarose gelöst in ddH ₂ O 0,01% Neutral-Rotlösung
<u>Puffer für Glas-cDNA Arrays:</u>	
TN-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl
TNT-Puffer	TN-Puffer + 0,05% Tween 20

TN Blocking-Puffer TNB	TN-Puffer + 0,5% Blockingreagenz
TNB-10% Ziegenserum-Puffer	9 ml TNB-Puffer 1 ml Ziegenserum
HRP-Inaktivierungslösung	10 µl 3 M NaAc 290 µl HRP-Inaktivierungsreagenz
Anti-Fluorescein-HRP-Konjugatlösung	4 µl Anti-Fluorescein-HRP-Konjugat 400 µl TNB-10% Ziegenserum-Puffer
Streptavidin-HRP-Konjugatlösung	4 µl Streptavidin-HRP-Konjugat 400 µl TNB-10% Ziegenserum-Puffer
Cyanin-3 Tyramidlösung	1 µl Cyanin-3 Tyramid 500 µl Amplifikationslösung
Cyanin-5 Tyramidlösung	1 µl Cyanin-5 Tyramid 500 µl Amplifikationslösung
RNA Ladepuffer	50% Glycerin 1 mM EDTA 0,4% Bromphenolblau
RNA Probenpuffer	10 ml deionisiertes Formamid 3,5 ml Formaldehyd (37%) 2 ml 5 x MOPS-Puffer
RNase H Stammlösung	10 mg/ml in H ₂ O gelöst, 15 min kochen (DNase-Inaktivierung); Lagerung bei - 20°C
<u>Waschpuffer für Clontech Arrays:</u>	
WASH I	2 x SSC; 1% SDS in H ₂ O
WASH II	0,1 x SSC; 0,5% SDS in H ₂ O
<u>Waschpuffer für Incyte Arrays:</u>	
WASH I	2 x SSC; 1 % SDS in H ₂ O

WASH II	0,6 x SSC; 1 % SDS in H ₂ O
<u>Westernttransferpuffer:</u>	
4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8	0,5 M Tris-HCl auf pH 6,8 einstellen und 0,4 % SDS hinzugeben
4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8	1,5 M Tris-HCl auf pH 8,8 einstellen und 0,4 % SDS hinzugeben
5x SDS Elektrophoresepuffer (1000 ml)	0,125 M Tris (15,1 g) 0,96 M Glycin (72 g) 0,5 % SDS (5 g) H ₂ O ad 1000 ml
6x SDS Probenpuffer(10 ml)	7 ml 4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 3 ml Glycerin 1 g SDS 0,6 M DTT (0,93 g) 1,2 mg Bromphenolblau
10%iges Trenngel (20 ml)	6,66 ml Acrylamid 5 ml 4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8 8,33 ml H ₂ O 66 µl 10% APS 13 µl TEMED
Blockinglösung	5% Milchpluver in Waschpuffer
Sammelgel (10 ml)	1,3 ml Acrylamid 2,5 ml 4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 6,1 ml H ₂ O 50 µl 10% APS 10 µl TEMED
Transferpuffer (10x)	25 mM Tris (30,3 g) 192 mM Glycin (144,2 g) H ₂ O ad 1000 ml
Wasch/Inkubationspuffer	0,2% Tween 20 in PBS-d

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Passage von Zellen

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien HeLa, BHK21 und A549 wachsen adhärent an einer Oberfläche bei 37°C. Damit sie wachsen können, werden sie in Zellkulturflaschen (Falcon 3023, 3028) oder in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) gehalten, in denen sie sich auf dem Boden anheften und vermehren können. Die Wachstumsfläche der Kulturflaschen beträgt 75 oder 175 cm³. Wenn die Zellen den Boden einer solchen Kulturflasche vollständig bedecken (Vollkonfluenz), werden sie in einer geeigneten Verdünnung in eine neue Kulturflasche überführt. Um eine Kontamination mit Fremdorganismen zu vermeiden, führt man alle Arbeitsschritte der Zellpassage an einer Sterilbank durch. Als Medium für die Zelllinien HeLa, BHK und A549 verwendet man 90% Dulbecco-modifiziertes-Medium, welches mit 10% fötalem Kälberserum versetzt wird. Beide Komponenten des Mediums werden in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt, in einem Endvolumen von 15, 30 bzw. 75 ml gemischt und in eine entsprechende Zellkulturflasche/ -schale gegeben. Das verbrauchte Medium der konfluenten Kulturflaschen wird in ein Abfallgefäß verworfen und die Kulturflasche zweimal mit PBS-d durchgespült. Nachdem das PBS-d ebenfalls verworfen worden ist, gibt man eine geeignete Menge (zwischen 2 und 5 ml) einer 0,25%igen Trypsinlösung zu den Zellen. Das Trypsin wird durch Schwenken gleichmäßig verteilt und etwa 2 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Durch das Einwirken des Trypsins werden die Zellen langsam vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die so entstandene Zellsuspension wird nun vorsichtig mit einer frischen Glaspipette zwei bis dreimal vorsichtig aspiriert und dann in einer entsprechenden Verdünnung in die neue Zellkulturflasche gegeben (HeLa und HFF:1/5; BHK und T637: 1/10). Um die Zellen homogen in der neuen Kulturflasche zu verteilen, wird die Kulturflasche ein bis zweimal geschwenkt. Die so passagierten Zellen wachsen nun innerhalb von zwei bis drei Tagen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre wieder bis zur Vollkonfluenz heran, so daß sie erneut passagiert werden müssen.

3.1.2 Zellernte

Bei der Gewinnung von Zellen ist wichtig, schonend vorzugehen, um aus ihnen DNA, RNA oder Proteine isolieren zu können. Die Zellernte läuft entsprechend Abschnitt 3.1.1 ab. Jedoch werden die Zellen nicht in eine neue Zellkulturflasche überführt, sondern in ein 15 ml Rotkappgefäß, welches vorher mit 5 ml frisch gemischtem Medium aufgefüllt wurde. Dieses frische Medium inhibiert die Wirkung des Trypsins. Um die Zellen zu schonen, ist dieses 15 ml Reaktionsgefäß auf +4°C in einem Eisbad heruntergekühlt. Nach der Ernte der Zellen, werden diese 5 min bei 500 g und +4°C zentrifugiert. Zur Entfernung von Mediumresten wird das Zellsediment mit gekühltem PBS gewaschen und noch einmal 5 min bei 500 g und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Zellsediment wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

3.1.3 Zellen einfrieren/auftauen

Zur längeren Lagerung von Zelllinien, besteht die Möglichkeit, die Zellen bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Hierzu werden die einzufrierenden Zellen wie bei der Zellernte behandelt (siehe Abschnitt 3.1.2) . Nur werden sie nicht direkt eingefroren, sondern mit einem speziellen Einfriermedium, welches neben 10 % FCS auch 10 % Glycerin enthält, versetzt. Wahlweise kann man dem Medium auch 20 % FCS zusetzen. Zum Auftauen der Zellen wird das Zellkulturmedium auf 37°C erwärmt. In einer Zellkulturflasche werden 25ml Medium vorgelegt. Die noch gefrorenen Zellen werden mit Hilfe einer Pasteurpipette immer wieder mit frischem Medium überschichtet. Mit einer weiteren Pasteurpipette überführt man die nun auftauenden Zellen in die vorbereitete Zellkulturflasche. Nach 24h Inkubation auf 37°C wechselt man das Medium und verfährt weiter nach Abschnitt 3.1.1.

3.2 Virusproduktion

3.2.1 Infektion von Zellen mit Viren

Ad12-Virionen benötigen in humanen Zelllinien im Normalfall 72 Stunden, um sich zu reproduzieren. Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 50 bis 60 % mit Viren inokuliert, um zu erreichen, daß eine möglichst hohe Zahl der Zellen mit dem Virus

infiziert wird. Die halbkonfluente Kulturflasche wird dem Inkubator entnommen und das darin enthaltene Medium vollständig abgenommen. Dann werden 10 % des Ursprungsvolumens an frischem Medium hinzugegeben. Anschließend werden, je nach Zelllinie die entsprechenden Virusinokula zugegeben (HeLa: 25 Pfu/Zelle; BHK21: 100 Pfu/Zelle; **Pfu = Plaque forming units = infektiöse Virionen**). Die Kulturflasche wird, nachdem sie gut verschlossen wurde, mehrmals geschwenkt, um die Virionen gleichmäßig zu verteilen. Die Kulturflasche wird nun über einen Zeitraum von zwei Stunden hinweg im 37°C Inkubator alle 20 min geschwenkt, um die Virionen zu verteilen. Nach dieser Zeit wird das Inokulum aus der Kulturflasche abgenommen und mit frischem Medium versetzt. Nun werden die Zellen bei 37°C für den gewünschten Zeitraum inkubiert.

3.2.2 Virusernte

Wenn 80 -100 % der infizierten Zellen einen cytophatischen Effekt (CPE) zeigen, das heißt sie lösen sich vom Boden der Gewebekulturflaschen und hängen zu mehreren wie eine Kette aneinander, können die neu produzierten Virionen geerntet werden. In der Regel werden die Zellen in bis zu 60 Gewebekulturflaschen vorbereitet und zur Virusproduktion herangezogen. Im Gegensatz zu anderen Viren befinden sich bei einer Adenovirusinfektion die meisten der neu gebildeten Virionen im Innern der Zellen und nicht im Überstand. Um die Zellen zu ernten, werden die Kulturflaschen mehrmals gegen den Handballen geschlagen. Dadurch lösen sich die Zellen vollständig vom Boden ab. Die Zellsuspensionen werden dann in 500 ml Zentrifugenbecher gegeben, die vorher auf +4°C gekühlt worden sind. Die Kulturflaschen werden zweimal mit einigen Millilitern Tris-Saline ausgespült, um die restlichen Zellen ebenfalls in die Zentrifugenbecher zu überführen. Anschließend werden die Zentrifugenbecher dann bei 500g und +4°C 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert, und das Sediment wird in 2-3 ml Tris-Saline aufgenommen. Die entstandene Zellsuspension wird in 15 ml Rotkappreaktionsgefäßen gesammelt und kann bei -20°C gelagert werden.

3.2.3 Virusreinigung

Die bei -20°C gelagerten Zellen werden in einem Eisbad aufgetaut. Sie werden dann mit einem Branson-450-Sonifier sechs mal je 20 Sekunden bei 50 Watt in einem

Eiswasserbad sonifiziert. Zwischen den Ultraschallbehandlungen wird jeweils 1 min gewartet, um eine zu starke Erwärmung der Zellsuspension zu verhindern. Unter dem Mikroskop wird überprüft, ob alle Zellen zerstört wurden. Die Zelltrümmer werden nun 5 min lang bei +4°C und 5700 g sedimentiert. Das Volumen des Überstandes, in dem sich nun die Virionen befinden, wird mit Hilfe einer Glaspipette bestimmt. Pro Milliliter Überstand werden 0,5 g festes Cäsiumchlorid eingewogen und zum Überstand gegeben, so daß eine Endkonzentration von $c = 0,5 \text{ g/ml CsCl}$ entsteht. Die Virussuspension wird nun auf Ultrazentrifugenröhrchen SW60 verteilt und mit Hilfe einer Cäsiumchloridlösung (0,5 g/ml) austariert. In einer Beckman L7-55 Ultrazentrifuge werden die Proben nun 10 bis 16 Stunden lang bei 40.000 Upm zentrifugiert. Die sich im CsCl- Gradienten ausgebildete Virusbande wird langsam ausgetropft. Soll aus den Virionen DNA präpariert werden, muß die Reinigung des Virus durch Gleichgewichtszentrifugation im CsCl Dichtegradienten zweimal wiederholt werden.

3.2.4 Viruskonzentrationsbestimmung (Partikelmenge)

Die Viruskonzentration wird mit einem Beckmann DU 640 Photometer an Hand der optischen Dichte bestimmt. Hierzu wird die Virussuspension 1:500 bis 1:1000 in Cäsiumchlorid ($c = 0,5 \text{ g/ml}$) verdünnt. Anschließend wird am Photometer die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Richtwert, den man zur Berechnung der Viruskonzentration heranzieht, liegt bei:

$$OD_{260\text{nm}}(\text{Virus}) = 1 \rightarrow 1 \cdot 10^{10} \text{ Pfu/ml (Doerfler und Burlingham, 1971)}$$

3.2.5 Viruskonzentrationsbestimmung durch Plaqueassay (infektiöse Einheiten)

Eine andere Möglichkeit zur Viruskonzentrationsbestimmung besteht durch den sogenannten Plaqueassay. Hierbei werden A549-Zellen in 6-Schälchen-Platten ausgesät. Das zu untersuchende Virus wird in einem Bereich von 10^5 bis 10^9 in Zellkulturmedium verdünnt und wie bei einer normalen Infektion zu den Zellen gegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wird das Inokulum abgenommen. Die infizierten Zellen werden nun mit 3 ml Plaquemedium pro Platte überschichtet und 5-7 Tage lang bei 37°C in einer 5%-igen CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Um die entstandenen Plaques zu erkennen, werden die Zellen mit Plaquemedium, das 0,01 µg Neutral-Rot pro Milliliter Medium enthält, überschichtet. Neutral-Rot färbt nur lebende Zellen, so daß nach der Färbung

die Plaques als weiße Flächen zwischen den rot gefärbten Zellen zu erkennen sind. Jeder Plaque geht auf ein infektiöses Viruspartikel zurück. Nun kann im Zusammenhang mit der jeweiligen Verdünnung der Titer infektiöser Partikel sehr genau festgestellt werden.

3.2.6 DNA-Präparation aus Virionen

Um die DNA aus Virionen zu isolieren, muß zunächst der hohe CsCl-Gehalt durch eine Dialyse gegen TE-Puffer aus der Suspension entfernt werden. Zunächst werden Dialyseschläuche zweimal für 10 min in TE-Puffer zum Sieden gebracht. Dabei wird nach jedem Kochschritt der Puffer gewechselt. Nun wird ein circa 10 cm langes Stück des Schlauches an einem Ende mit einer Klammer versiegelt. Die Virussuspension wird nun in den Schlauch eingefüllt, und der Schlauch auch am anderen Ende mit einer Klammer verschlossen. Die so präparierten Schläuche werden unter ständigem Rühren mindestens eine Stunde lang in einem zwei Liter Erlenmeyerkolben gegen einen Liter TE-Puffer bei 4°C dialysiert. Dabei wird der Puffer vier Mal gewechselt. Danach wird die Virussuspension in ein 15 ml Rotkappreaktionsgefäß, das auf Eis vorgekühlt worden ist, überführt und das Volumen bestimmt.

Um die Virionen zu öffnen, werden nun 1/10 Volumen Proteinase K-Lösung in 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5 ($c = 10 \text{ mg/ml}$) sowie 1/10 Volumen 10 % SDS hinzugegeben. Dieses Gemisch wird für zwei Stunden bei 37°C im sich langsam drehenden Reagenzglasinkubator inkubiert. Anschließend erfolgt die DNA-Extraktion mittels einer Phenol-Chloroformreinigung (siehe Abschnitt 3.3.1). Zur DNA-Präzipitation und DNA-Konzentrationsmessung siehe Abschnitt 3.3.2 und Abschnitt 3.3.3.

3.3 DNA-Präparation

Die zu öffnenden Zellen werden im 15 ml Rotkappreaktionsgefäß in einem Eisbad aufgetaut und mit 0,8 ml Proteinase K-Puffer versehen. Hinzu kommen desweiteren 100 µl Proteinase K ($c = 10 \text{ mg/ml}$), 100 µl 10 % SDS sowie 100 µl RNase A ($c = 10 \text{ mg/ml}$) gelöst in 2 x SSC. Dieses Gemisch wird dann 12 - 14 h im Reagenzglasinkubator bei 37°C inkubiert.

3.3.1 DNA-Reinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Ausgangspunkt für die Phenol-Chloroform-Extraktion ist die in Abschnitt 3.3 gewonnene Lösung, aus der die DNA isoliert werden, sowie Proteine und RNA entfernt werden soll. Dazu wird im Verhältnis 1:1 Phenol zugegeben. Diese Lösung wird 10 min lang bei RT im Reagenzglasrotator bei hoher Geschwindigkeit gemischt und anschließend bei 2.500 Upm für 10 min in einer Heraeus Minifuge-RT zentrifugiert. Bei der Zentrifugation bilden sich eine unpolare Phenolphase und eine polare wässrige Phase aus. Die wässrige Phase, in der sich die Nukleinsäure befindet, wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen wird bestimmt, und ein Gemisch aus Phenol und Chloroform (1:1) wird im Verhältnis 1:1 zu der wässrigen Phase hinzugegeben. Anschließend wird die Lösung wieder 10 min lang im Rotator gemischt, und anschließend 10 min lang bei 2.500 Upm zentrifugiert. Es bilden sich erneut zwei Phasen, von denen die obere (wässrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird. Um alle Phenolreste aus der Lösung zu entfernen, gibt man nun in einem Verhältnis von 1:1 ein Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) hinzu. Es folgen die Inkubation im Rotator sowie die Zentrifugation. Es wird wie schon beschrieben die obere Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.3.2 DNA-Präzipitation

Zu einer DNA-Lösung wird 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,0 sowie das 2,5-fache Volumen an -20°C kaltem absolutem Ethanol gegeben. Man inkubiert das Gemisch über Nacht bei -20°C, damit die DNA quantitativ aus der Lösung ausfallen kann. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm und +4°C, bei der die DNA als Sediment am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar wird, wird der Überstand verworfen. Die DNA wird nun zweimal mit 0,5 ml Ethanol (70%) gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift die Lösung 10 min lang bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert wird. Anschließend nimmt man den Überstand komplett ab und lässt die DNA 30 bis 60 min bei RT trocknen. Die DNA wird dann in TE-Puffer aufgenommen und in einem 37°C-Wasserbad inkubiert, bis sie sich vollständig gelöst hat. Nun kann die DNA bei 4°C gelagert werden.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (Freifelder und Better, 1982), (Kaiser und Hogness, 1960)

Als Nullprobe dienen 50 - 100 μl ddH₂O bzw. der Puffer, in dem die DNA gelöst ist. Die DNA-Lösung unbekannter Konzentration wird im entsprechenden Lösungsmittel 1:500 verdünnt. Von der Endverdünnung werden 50 μl in eine Quarzküvette gegeben und die Absorption der Lösung bei 260 nm gemessen. Ein Wert der optischen Dichte von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Bei einer RNA-Lösung ist dieser Wert geringfügig niedriger. Ein Wert von 1 entspricht hier einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$.

3.4 DNA-Analyse

3.4.1 Restriktionsanalyse (Nathans und Smith, 1975)

DNA enthält Sequenzmotive, die von bestimmten Enzymen erkannt werden und welche den DNA-Doppelstrang an dieser Stelle mit glatten oder versetzten Enden durchtrennen. Solche Restriktionsendonukleasen werden unter anderem zur Suche nach Restriktionsstellen in der DNA eingesetzt oder mit ihnen werden Restriktionsmuster überprüft.

Die hier durchgeführten Restriktionsanalysen werden in einem Gesamtvolumen von 20 μl durchgeführt. Zu einer Restriktionsanalyse bedarf es in den hier verwendeten Protokollen 1 μg der zu analysierenden DNA, 2 μl des für das Enzym optimalen 10-fach konzentrierten Restriktionspuffers sowie von ein bis zehn Einheiten des Restriktionsenzym. Die Menge des einzusetzenden Enzyms richtet sich nach der Menge und Art der zu schneidenden DNA. Handelt es sich um virale DNA oder Plasmid-DNA, so reicht eine Einheit des Enzyms aus, während bei genomischer DNA zehn Einheiten des Enzyms pro Restriktionsansatz verwendet werden. Der Restriktionsansatz wird mit ddH₂O auf 20 μl Endvolumen aufgefüllt. Je nach Arbeitsoptimum des Enzyms wird der Restriktionsansatz ein bis zwei Stunden bei +25 bis +37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Restriktion wird danach mit 3 μl 6-fach konzentriertem Stoppmix beendet. Die DNA Fragmente können nun mit Hilfe einer Gelelektrophorese (Abschnitt 3.4.2) sichtbar gemacht werden.

3.4.2 Gelelektrophorese und DNA-Visualisierung

Zur visuellen Analyse können die durch Restriktionsenzymsspaltung entstandenen DNA Fragmente im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dazu wird ein 0,7 bis 2%-iges Agarosegel mit 1-fach konzentriertem TBE-Puffer gegossen. Als Laufpuffer dient ebenfalls 1-fach konzentriertes TBE. Verwendete DNA-Größenstandards sind die MBI Generuler 100bp Leiter und der MBI λ -DNA Marker (siehe Material). Es werden 10 μ l des Restriktionsansatzes in die Geltaschen gegeben und elektrische Spannung angelegt. Die elektrische Spannung sollte 15 Volt pro cm Gellänge nicht überschreiten, da das Gel überhitzen könnte und eine saubere Auftrennung der DNA-Fragmente dann nicht mehr gewährleistet ist. Die elektrische Spannung sollte eine Gesamtvoltzahl von 25 Volt nicht unterschreiten, um lateraler Diffusion der DNA vorzubeugen. Die beiden dem DNA-Auftragspuffer zugegebenen Farbmarker Bromphenolblau und Xylencyanol dienen als Laufkontrollen. Nachdem das Bromphenolblau 2/3 der Gellänge zurückgelegt hat, wird die Gelelektrophorese beendet. Das Gel wird 5 min in einer Ethidiumbromidlösung (2 μ g/ml) bei Raumtemperatur inkubiert und danach weitere 10 min in ddH₂O gelagert. Der in der DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid zeigt nun durch UV-Lichtanregung auf einem Transilluminator die aufgetrennten DNA-Fragmentebanden an. Deren Größe läßt sich anhand der definierten DNA-Größenstandards abschätzen.

3.5 RNA Analysen

3.5.1 RNA-Präparation

Die in den Versuchen verwendete RNA wird mit Hilfe des RNeasy Mini/Midi-Kits der Firma Qiagen sowie dem Nucleospin L-Kit der Firma Macherey&Nagel isoliert. Dabei werden die Anweisungen der mitgelieferten Protokolle befolgt. Der Unterschied zwischen beiden Protokollen besteht darin, daß mit dem RNeasy-Kit cytoplasmatische RNA und mit dem Nucleospin Kit die gesamte RNA isoliert wird.

3.5.2 DNase-Behandlung von RNA-Proben

Um sicher zu gehen, daß in den RNA-Eluaten keine DNA mehr vorhanden ist, werden die RNA-Proben des RNeasy Kits mit DNase behandelt. Dazu wird zu der Probe 1/10 ihres Volumens an 10-fach konzentriertem DNase-Puffer zugegeben sowie 10 Einheiten DNase. Der Ansatz wird 30 min lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur Trennung der RNA von Proteinen wird sie im Anschluß einer Phenol-Chloroform-Behandlung

unterzogen. Diese Behandlung unterscheidet sich von der DNA-Reinigung darin, daß hier Phenol mit einem pH-Wert von 4,3 verwendet wird. Anschließend wird die RNA präzipitiert, wie im Abschnitt 3.5.3 beschrieben wird. Die RNA wird in 30 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und bei -20°C oder -80°C gelagert.

Beim Nucleospin Kit entfällt diese DNase-Behandlung, da dieser Schritt schon während der Isolierung auf der Säule stattfindet.

3.5.3 RNA-Präzipitation

Nach der Phenol-Chloroform-Behandlung wird zunächst das Volumen der RNA-Lösung mit Hilfe einer Pipette bestimmt. Zu dieser Menge gibt man nun soviel 2 M Natriumacetat pH 4,3 dazu, bis eine Endkonzentration von 0,3 M erreicht ist. Desweiteren wird wie bei der DNA-Präzipitation das 2,5-fache an -20°C kaltem absoluten Ethanol hinzugegeben und über Nacht bei -20°C gelagert. Am folgenden Tag wird die RNA bei 13.000 Upm und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wird wieder abgenommen und zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Dabei wird nach jedem Waschschrift der Überstand vorsichtig abgenommen, und das Sediment nach dem letzten Waschschrift für 30 - 60 min bei RT getrocknet. Anschließend wird die RNA in RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei -20°C oder -80°C (für Langzeitlagerung) gelagert.

3.5.4 RNA-Visualisierung

Die RNA kann nun mittels einer Gelelektrophorese auf Degradation überprüft werden. Das Prinzip dieser Gelelektrophorese ist dem der DNA-Gelelektrophorese gleich, jedoch wird das RNA-Gel mit 0,5-fach konzentriertem TBE hergestellt. Der Laufpuffer besteht ebenfalls aus 0,5-fach konzentriertem TBE. 1 µg der aufzutragenden RNA wird in 10 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min im 65°C warmen Wasserbad denaturiert. Anschließend wird die Probe mit 1 µl RNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltasche gefüllt, und das elektrische Feld wird angelegt. Nach der Färbung mit Ethidiumbromid lassen sich bei hochwertiger RNA die Banden der eukaryotischen 28 S-, 18 S- und 5 S-RNA identifizieren.

3.5.5 RT-PCR (Chen und Fuggle, 1993)

Mit Hilfe der RT-PCR lassen sich spezifische Sequenzen aus allen Arten von RNA amplifizieren. Zunächst wird die RNA durch die **Reverse Transkriptase (RT)** in DNA überschrieben. Danach läuft die eigentliche Polymerasekettenreaktion (Saiki et al.,

1988) ab (**PCR** = engl. **p**olymerase **c**hain **r**eaction). Voraussetzung für die PCR ist die Kenntnis der DNA-Sequenzen, die den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Dort binden in der Reaktion die sequenzspezifischen Primer, welche von der temperaturstabilen Taq-DNA-Polymerase erkannt und verlängert werden. Alle durchgeführten RT-PCRs werden in einer Geneamp PCR-Maschine 2400 von Perkin Elmer vorgenommen. Alle RT-PCRs werden mit dem Access RT-PCR Kit der Firma Promega durchgeführt. Der Reaktionsansatz besteht aus 100 ng gesamter RNA, jeweils 50 ng sequenzspezifischer Primer, je 10 mM der vier dNTPs, 10x konzentriertem Enzympuffer sowie je 5 Einheiten der AMV (Avian Myeloblastosis Virus) reversen Transkriptase und der Tfl-DNA-Polymerase versetzt. Die Magnesiumsulfatkonzentration wird den Bedingungen der jeweiligen Primer angepasst und variiert zwischen 1 und 2,5 mM. Das finale Volumen wird auf 25 µl aufgefüllt.

Die Bedingungen und Teilschrittbeschreibungen eines RT-PCR-Standardansatzes sind der folgenden Tabelle (Tabelle 3.1) 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
hold	4	-	Kühlung

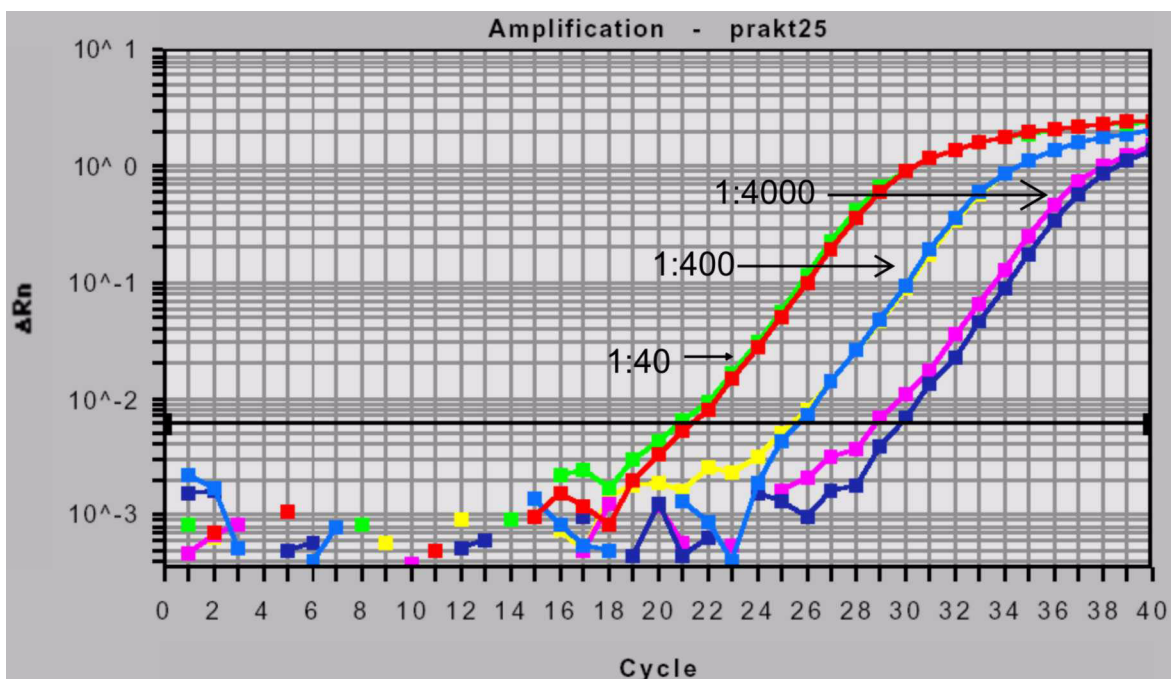
Tabelle 3.1: Bedingungen und Teilschrittbeschreibungen einer RT-PCR.

Nach Beendigung der RT-PCR werden 5 µl DNA-Stopgemisch zugegeben und 10 µl des Gemisches auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.4.2).

3.5.6 Quantitative Realtime PCR (Q-RT-PCR)

Die quantitative Realtime PCR dient dazu, die Expression bestimmter Gene nicht nur qualitativ zu bestimmen, sondern sie im Vergleich zu einem Referenzgen auch quantitativ darzustellen. In dieser Arbeit dient die Methode dazu, die Ergebnisse aus den Arrayexperimenten zu überprüfen und zu bestätigen. In den hier beschriebenen Experimenten wird mit einem TaqMan (Applied Biosystems) sowie sogenannten Assay-on-demand Proben gearbeitet. Diese Proben enthalten neben den beiden benötigten Primern auch eine fluoreszenz-markierte DNA-Sequenz, die an die entsprechende komplementäre Zielsequenz binden kann. Hat die Probe während der Amplifikation an die Komplementärsequenz gebunden, kommt die Polymerase zu einem bestimmten Zeitpunkt in räumliche Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff und spaltet diesen ab. Hat die Probe nicht gebunden, kann die Polymerase den Farbstoff nicht abspalten. Im Laufe der PCR entsteht so nun immer mehr freigesetzte Fluoreszenz, die vom TaqMan detektiert werden kann. In Abbildung 3.1 ist ein Beispiel für die graphisch umgesetzten gesammelten Fluoreszenzen dargestellt.

Abbildung 3.1: Beispiel für eine Amplifikationskurve im TaqMan ABI 7700.



Von der zu untersuchenden RNA wird zunächst 1 µg mit Hilfe der Superscript II

Reversen Transkriptase (Invitrogen) in cDNA überschrieben. Von dieser cDNA werden Verdünnungen von 1:40, 1:400 sowie 1:4000 hergestellt. Diese Verdünnungen dienen als Template für die PCR. Der Standardansatz für eine Q-RT-PCR enthält:

12,5 µl 2x PCR Mastermix

1,25 µl 20 x TaqMan-Probe

4 µl Template cDNA

H₂O *ad* 25 µl Gesamtvolumen (7,25 µl)

Abbildung 3.1 zeigt die unterschiedlichen Verdünnungen der cDNA. Als Beispiel dient hier das β -Aktin, das auch in den durchgeführten Experimenten als interner Standard benutzt wird. Die verschiedenen Kurven überschreiten die schwarze Linie in unterschiedlichen Zeitpunkten während der Amplifikation. Diesen Wert bezeichnet man als Schwellenzyklus oder „threshold cycle“. Anhand dieser Werte kann man die verschiedenen Gene im Verhältnis zum Standardgen vergleichen.

3.6 Proteinanalysen

3.6.1 Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Infizierte oder uninfizierte Zellen in einer Gewebekulturflasche werden zweimal mit PBS-d gewaschen und dann mit einem Gummischaber von der Plastikfläche abgelöst. Die Zellen werden in ein Zentrifugengefäß pipettiert, bei 500 g sedimentiert und in 250 µl PBS-d resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl T-PER Lösung (Pierce) inkubiert man die Zellen 5 min lang bei RT. Zellreste werden bei 10.000 Upm 1 min zentrifugiert, der proteinhaltige Überstand in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

3.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976)

Die Proteinkonzentration wird mit Coomassie Brilliant Blue G-250 bestimmt, dessen Absorptionsmaximum sich nach Bindung an Proteine von $\lambda = 495$ nm auf $\lambda = 595$ nm verschiebt. Hierzu wird 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 werden 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 RT wird die optische Dichte bei 595 nm gemessen.

3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine nach ihrer Größe in einem diskontinuierlichen Puffersystem gelelektrophoretisch getrennt. Das Prinzip dieses Gelsystems besteht darin, daß verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Oberflächenladung in denaturiertem Zustand proportional zu ihrem Molekulargewicht ein SDS-Molekül pro drei Aminosäureresten anlagern (Weber *et al.*, 1972). Die daraus resultierende negative Oberflächenladung, die für alle behandelten Proteine nach dem gleichen Prinzip erfolgt, ermöglicht eine Auftrennung ausschließlich nach der Proteingröße.

Ein SDS-Polyacrylamidgel besteht aus zwei verschiedenen SDS-enhaltenden 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.

3.6.3.1 Gelpräparation

Für die SDS-PAGE werden zwei unterschiedlich große, gründlich gereinigte Glasscheiben mit entsprechenden Spacern versehen und in eine Gelgießvorrichtung einer BioRad Mini-Protean 2 Gelkammer eingespannt. Zunächst wird ein 10%iges Trenngel (siehe Abschnitt 2.11) blasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und mit 2 ml H₂O überschichtet, um eine klare Trennlinie zu erreichen. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist, wird das Wasser entfernt und das Sammelgel (siehe Abschnitt 2.11) ebenfalls blasenfrei über das Trenngel gegossen. Sofort nach dem Giessen des Sammelgels wird ein Gelkamm in das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingebracht, um die Auftragesaschen für die Proteinproben zu formen. Nach der Polymerisation des Sammelgels werden die beiden Glasscheiben aus der Gießvorrichtung entfernt und in der Laufkammer positioniert. Nun wird der Kamm entfernt und die Gelkammer mit Laufpuffer (siehe Abschnitt 2.11) gefüllt. Die Proteinproben werden mit 8,33 µl 6 x Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.11) versetzt, 5 min lang im 95°C Heizblock inubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt nun 1 h lang bei 150

Volt.

3.6.3.2 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Westerntransfer) (Burnette, 1981)

Die während der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden in einer Transferkammer (BioRad) auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF) Membran übertragen. Die Membran wird kurz in Methanol angefeuchtet und dann in Transferpuffer (siehe Abschnitt 2.11) gelegt. Ebenso werden die beiden benötigten Whatmanpapiere und die zur Transferkammer gehörigen Schwämme in Transferpuffer eingelegt. Der Transferaufbau ist wie folgt: Schwamm - Whatmanpapier - PVDF-Membran - Gel - Whatmanpapier - Schwamm. Diese Konstruktion wird nun mit Hilfe beiliegender Klammern in der richtigen Orientierung in die Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt nun entweder 1 h lang bei 250 mA oder bei 40 mA über Nacht (ü.N.).

3.6.3.3 Proteinnachweis durch spezifische Antikörper

Nach dem Proteintransfer auf eine PVDF-Membran wird diese in 50 ml Blockinglösung (siehe Abschnitt 2.11) entweder 1 h lang bei RT oder bei 4°C ü.N. geschüttelt. Anschließend wird die Blockinglösung verworfen und durch 25 ml Wasch/Inkubationslösung (siehe Abschnitt 2.11) ersetzt, zu der man in einer 1:1000 Verdünnung den 1. Antikörper gegen das spezifische Antigen gibt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wird die Membran 3 x je 10 min lang in frischem Waschpuffer gewaschen. Dann erfolgt die Inkubation des zweiten, an eine Peroxidase gekoppelten Antikörpers, der ebenfalls in 25 ml Inkubationslösung 1:5000 verdünnt auf die Membran gegeben wird. Zum Abschluß wird die Membran wiederum 3 x je 10 min lang in Waschpuffer gewaschen.

3.6.3.4 ECL-Lichtreaktion

Die zu identifizierenden Proteine werden indirekt mittels der ECL-Lichtreaktion über die Peroxidase des zweiten Antikörpers detektiert. Das Kit zur ECL-Lichtreaktion stammt von der Firma Amersham und wird den Herstellerangaben folgend angewandt. Die Membran wird mit Hilfe einer CCD-Kamera (Fuji) fotografiert.

3.7 Array-Technik

Die Array-Technik wurde von Schena und Brown im Jahre 1995 entwickelt (Schena *et al.*, 1995). Sie wird dafür eingesetzt, um in einem einzigen Experiment das Expressionsmuster von einer Vielzahl von Genen zu überprüfen. In den Anfängen dieser Technik wurden dabei Nylonmembranen verwendet, auf die mehrere hundert DNA-Fragmente aufgebracht wurden. Dabei entsprechen diese Fragmente dem 3'-Ende der zu untersuchenden Gene mit einer Länge von 300 - 1.000 bp. Der Vorteil dieser Membranen liegt in ihrer mehrfachen Verwendbarkeit. Man kann mit ihnen bis zu 3 verschiedene Hybridisierungen durchführen.

Heute allerdings verwendet man fast ausschließlich Glasarrays, auf die die zu untersuchenden Gene aufgebracht werden. Hier bestehen die Fragmente aus Oligomeren mit einer Länge von 20 -25 bp, die auch die 3'-Bereiche der entsprechenden Gene umfassen. Mit fortschreitender Technik ist es mittlerweile möglich, bis zu 30.000 Gene auf einen Objektträger aufzubringen. Zwar kann man diese Objektträger nur einmal verwenden, jedoch liegt ihr Hauptvorteil darin, zwei unterschiedliche RNA-Populationen in einem Experiment zu untersuchen.

Das Prinzip der membrangebundenen Array-Technik besteht darin, daß die zu untersuchende RNA, die neben der ribosomalen RNA auch die sogenannte messenger RNA (mRNA) enthält, mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in eine radioaktiv markierte cDNA-Sonde umgeschrieben wird. Als Primer dient hierfür ein Oligo-dT Primer, der die Poly-A-Enden der isolierten mRNAs erkennt. Somit werden alle anderen RNAs, die keinen Poly-A Fortsatz tragen (rRNA, tRNA etc.), ausgeschlossen. Nach Reinigung der Sonde hybridisiert diese mit den sich auf der Nylonmembran befindenden Genfragmenten. Wird ein Gen stark exprimiert, erhält man an der entsprechenden Stelle ein starkes Signal, wird es jedoch nicht oder nur schwach exprimiert, ist an der entsprechenden Stelle auf der Membran kein bzw. ein schwächeres Signal zu erkennen. Auf diese Weise lassen sich die Expressionsmuster der unterschiedlichsten Zelllinien und Gewebe in einem großen Rahmen übersichtsartig untersuchen.

Für die hier vorgestellten Experimente werden zwei unterschiedliche Nylonmembranen benutzt. Für die Untersuchung von Expressionsmustern menschlicher Gene werden sogenannte Lifegrid Arrays der Firma Incyte Genomics verwendet. Um die Expressionsmuster von Hamstergen zu untersuchen, werden Maus Arrays der Firma Clontech verwendet.

Die Transkriptionsmuster menschlicher Gene werden ebenfalls mit Hilfe der Glas-cDNA-

Arrays untersucht. Bei dieser Technik wird die RNA ebenfalls mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Allerdings wird bei dieser Reaktion entweder ein biotinyliertes oder ein Fluorescein-markiertes Nukleotid in die entstehende cDNA eingebaut. Nach Hybridisierung der beiden Sonden mit den DNA Proben auf dem Objektträger erhält man vier unterschiedliche Signale. Wird ein Gen der sogenannten „Sample-RNA“, in diesem Fall Ad12 infizierte Zellen, stärker exprimiert als das entsprechende Gen der „Referenz-RNA“, hier mock infizierte Zellen, erhält man ein rot leuchtendes Signal. Ein grün leuchtendes Signal kann man sehen, wenn ein Gen der Referenz-RNA stärker exprimiert ist als das gleiche Gen in der Sample-RNA. Sind beide Gene in etwa gleich stark exprimiert, ist dies durch ein gelb leuchtendes Signal zu erkennen. Kein Signal ist zu sehen, wenn ein Gen weder in der Sample- oder Referenz-RNA exprimiert wird. Um Unterschiede in der Inkorporationseffizienz der beiden Fluoreszenz-markierten cDNAs auszugleichen, werden pro Experiment zwei Ansätze der gleichen RNA angesetzt. Allerdings werden dabei die markierten Nukleotide in den beiden Ansätzen getauscht. Ein solches Experiment nennt man auch „Dye-swap“-Experiment.

Für die hier durchgeführten Experimente werden Glasarrays benutzt, die von der WCN Expression Array Platform (Wallenberg Consortium North) in Uppsala hergestellt worden sind. Auf ihnen befinden sich 8.000 bekannte menschliche Gene.

3.7.1 Lifegrid Arrays (Incyte Genomics)

Die Untersuchung der Expressionsmuster menschlicher Gene wurde mit Hilfe des Lifegrid Array Kits durchgeführt. Dabei wurden die Anweisungen des mitgelieferten Protokolls befolgt. Ein Standardansatz für die Reverse Transkription enthält:

5 µg der zu analysierenden RNA (alternativ 200 ng mRNA) werden zusammen mit 5 µl der Kontroll-RNA sowie 2 µl des modifizierten Oligo-dT Primer in einem Gesamtvolumen von 15 µl gemischt. Diese Lösung wird 10 min lang bei 70°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wird die Probe für 5 min bei RT gehalten, damit die Primer an ihren Matrizen binden können. Hinzu kommen dann 8 µl des Reaktionspuffers, 2 µl der dNTPs (je 10 mM), 4 µl α -³³P dCTP (c= 10 µCi/µl), 1 µl der Reversen Transkriptase (c= 200 Einheiten/µl) sowie 10 µl nukleasefreies Wasser. Diese Lösung wird 2 h lang bei 42°C in einem Wasserbad inkubiert. Mit Hilfe der mitgelieferten Gelfiltrationssäulen wird die Sonde nun von nicht inkorporierten Nukleotiden gereinigt. Allerdings werden vor diesem Schritt 2 µl der Lösung für die Quantifizierung abgenommen. Nach einer 2 min

Zentrifugation bei 735 g für werden wiederum 2 µl der nun gereinigten Sonde abgenommen und zusammen mit der ersten Probe im Szintillationscounter gemessen. Dabei sollte der Prozentsatz der inkorporierten radioaktiven Nukleotide bei mindestens 25 % liegen, um eine erfolgreiche Hybridisierung zu ermöglichen. Die Sonde kann nun bis zur Hybridisierung auf Eis gelagert werden.

Die Nylonmembran wird mindestens 2h lang bei 42°C in 15 ml Prähybridisierungslösung in einem Rollinkubator inkubiert. Danach wird diese Lösung verworfen, und ein neues Aliquot von 15 ml Hybridisierungslösung mit 50 µl Heringsspermien-DNA (c= 10 mg/ml) wird hergestellt. Die radioaktiv markierte cDNA wird nun für 3 min bei 95°C denaturiert und für 5 min in einem Eiswasserbad gekühlt. Die so behandelte Sonde wird zur Hybridisierungslösung gegeben. Zum Abschluß dieses Vorgangs wird das Gemisch zur Nylonmembran gegeben und 14 - 16 h lang bei 42°C unter ständigem Drehen inkubiert.

Nach der Hybridisierung wird die Lösung in einem Abfallbehälter entsorgt. Die Waschprozedur besteht aus einer Kombination von verschiedenen Waschpuffern (2 x SSC, WASH1, WASH2). Alle Waschschrte außer der Inkubation mit 2 x SSC (5 min bei RT) erfolgen 30 min lang bei 68°C unter ständigem Drehen im Rollinkubator. Anschließend kann die Membran der Glasröhre entnommen und in Plastikfolie eingewickelt werden. Um ein Ergebnis zu erhalten, kann nun wahlweise ein Röntgenfilm oder eine Phosphoimagerplatte auf die Membran gelegt werden. Dabei ist zu beachten, daß die Phosphoimagerplatte mindestens 16 Stunden auf der Membran liegt, um auch wirklich alle Signale der Membran zu erfassen. Die entstandenen Bilder kann man an die Firma schicken, die diese dann analysieren.

Diese Nylonmembranen kann man bis zu 3 Mal wiederverwenden. Dazu muß man die radioaktiven Signale von der Membran entfernen. Das sogenannte "Strippen" erfolgt durch Inkubation der Membran mit Strippinglösung. In diesem Fall handelt es sich um ein Gemisch aus 0,1x SSC und 0,5 % SDS. Diese Lösung wird zum Sieden gebracht und dann in jeweils 100 ml Aliquots insgesamt 3 Mal auf die Membran gebracht. Die Inkubation erfolgt bei 90 °C im Rollinkubator jeweils 20 min. Nach der letzten Inkubation wird die Membran wieder in Frischhaltefolie verpackt. Das Ergebnis des Stripvorgangs wird durch eine Autoradiographie mit einem Röntgenfilm überprüft.

3.7.2 Maus Arrays (Clontech)

Um die Expressionsmuster von Hamstergenen zu untersuchen, werden Maus Atlas Arrays der Firma Clontech verwendet. Da keine Hamsterarrays zur Verfügung standen, wurden Maus Arrays verwendet. Sequenzvergleiche zwischen Maus und Hamster

ergaben eine eine signifikante Sequenzhomologie zwischen 85 und 96%. Somit erschien die Verwendung der Maus Arrays gerechtfertigt. Auch hier werden die Anweisungen des mitgelieferten Handbuchs befolgt.

Zunächst werden die folgenden Reagenzien miteinander gemischt:

- 4 μ l 5 x Reaktionspuffer
- 2 μ l 10 x dNTPs (ohne dCTP)
- 7 μ l [α -³²P]dCTP (3.000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l)
- 1 μ l DTT (100mM)

Dieses Gemisch wird bis zur Verwendung bei RT gelagert. Dann werden zwei Wasserbäder vorbereitet. Das eine wird auf 70°C, das andere auf 48°C vorgewärmt. Nun werden 2 - 5 μ g der zu analysierenden RNA mit 1 μ l des sogenannten CDS Primer-Mixes, der eine Mischung aller für den Array relevanten Primer enthält, in einem Gesamtvolumen von 6 μ l gemischt. Dieses Gemisch wird 2 min lang im 70°C Wasserbad erhitzt und anschließend weitere 2 min bei 48°C. Während dieser Inkubation wird dem Reaktionsgemisch, das bei RT lagert, 1 μ l der Reversen Transkriptase hinzugefügt. Nun wird das Reaktionsgemisch der zu analysierenden RNA zugegeben und für weitere 25 min bei 48°C inkubiert. Nach der Umwandlung der mRNA in cDNA wird die Sonde nun über eine Gelfiltrationssäule gereinigt. Dazu wird die Sonde in 180 μ l Puffer NT2 aufgenommen, auf die Säule aufgetragen und eine Minute bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nun folgen drei Waschschriffe mit jeweils 400 μ l Puffer NT3. Nach jedem Waschvorgang wird der abzenrifugierte Durchfluß verworfen und durch neuen Puffer NT3 ersetzt. Zum Eluieren der gereinigten Sonde werden 100 μ l des Puffer NE auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten bei RT wird die Säule nochmals für eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Es folgt die Szintillationszählung der Sonde, um die Inkorporation radioaktiv markierter dCTPs zu testen. Dazu werden jeweils 2 μ l der Sonde abgenommen und im Szintillationscounter gemessen. Dabei sollte die Sonde mindestens einen Wert von 2×10^6 cpm aufweisen. Ist dies der Fall, kann die Sonde bis zur weiteren Verwendung auf -20°C gelagert werden.

Zur Prähybridisierung der Membran erwärmt man 6 ml der mitgelieferten Hybridisierungslösung ExpressHyb auf 68°C. Anschließend werden 0,6 mg der Heringsspermien-DNA Lösung für 5 min bei 95 - 100°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die beiden Lösungen werden vermischt und bis zur Prähybridisierung bei 68°C gelagert. Die Nylonmembran wird in eine Glasröhre gegeben, mit der erwärmten

Prähybridisierungslösung versetzt und mindestens eine halbe Stunde lang bei 68°C unter ständigem Drehen in einem Rollinkubator inkubiert.

Die Sonde wird für die Hybridisierung durch Zugabe von 11 µl einer 10-fach konzentrierten Lösung (1M NaOH, 10 mM EDTA) denaturiert. Dieses Gemisch wird 20 min bei 68°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden 5 µl C₀t-1 DNA der Maus sowie 115 µl einer 2-fach konzentrierten Neutralisierungslösung (1 M NaH₂PO₄, pH 7,0) zur Sonde zugegeben und 10 min bei 68°C inkubiert. Diese Lösung wird nun zu der vorbehandelten Nylonmembran gegeben und über Nacht bei 68°C unter ständigem Drehen inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Membran mit WASH 1 (2 x SSC, 1 % SDS) und WASH 2 (0,1 x SSC, 0,5 % SDS) im Rollinkubator bei 68°C gewaschen: 4 x 30 min 200 ml WASH 1, 30 min 200 ml WASH 2, 5 min 200 ml 2 x SSC bei RT. Nun kann die Membran aus der Glasröhre entfernt, in Frischhaltefolie verpackt und auf Röntgenfilm autoradiografiert werden.

Da auch diese Membranen bis zu 4 Mal rehybridisiert werden können, besteht die Möglichkeit die radioaktiven Signale wieder von der Membran zu entfernen. Dazu erhitzt man 500 ml 0,5%iges SDS bis zum Sieden. Die Membran wird 5 - 10 min lang in diese kochende Lösung gelegt, um die radioaktiv markierte Sonde zu entfernen. Anschließend läßt man die sogenannte Strippinglösung noch 10 min lang abkühlen. Es folgt ein kurzes Waschen der Membran mit WASH 1 bei RT. Jetzt kann sie wieder in Frischhaltefolie verpackt werden, um das Entfernen der ³²P-markierten Sonde mittels Autoradiographie zu überprüfen.

3.8 Glas-cDNA-Arrays (Uppsala)

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, um RNA in fluoreszenz-markierte cDNA umzuschreiben. In den hier vorgestellten Experimenten wird das sogenannte TSA (Tyramide Signal Amplification) Labeling and Detection Kit der Firma Perkin Elmer verwendet. Hierzu werden jeweils 5 µg cytoplasmatische RNA mit 1 µl Reaktionsmixkonzentrat und 1 µl biotinyliertem bzw. fluorescein-markiertem dCTP gemischt und mit H₂O zu einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wird für 10 min in einem 65°C Wasserbad inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen. Anschließend wird der Reaktionsansatz für 5 min auf RT abgekühlt. Dann wird der

Ansatz 3 min lang im 42°C Wasserbad inkubiert, bevor man 2,5 µl eines 10-fach konzentrierten Reaktionspuffers sowie 2 µl eines AMV RT/RNase Inhibitormixes dazu pipettiert. Nach 1 h Inkubation im 42°C Wasserbad wird das Reaktionsgemisch 5 min auf 4°C heruntergekühlt. Um die Reaktion zu stoppen, fügt man dem Ansatz 2,5 µl 0,5M EDTA (pH 8,0) sowie 2,5 µl 1M NaOH hinzu. Nach weiteren 30 min bei 65°C (Denaturierung der noch vorhandenen RNA) wird das Gemisch auf 4°C abgekühlt und durch Zugabe von 6,5 µl 1M Tris-HCl (pH7,5) für die Reinigung vorbereitet.

Die Reinigung erfolgt in Microcon YM-100 Säulen der Firma Millipore. Es werden 200 µl 10mM Tris-HCl (pH 7,5) auf die Säule gegeben. Die markierte cDNA-Sonde wird dazu pipettiert und in einer Tischzentrifuge bei 2,300 Upm 10 min zentrifugiert. Die Probe wird mit 400 µl Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen und solange bei 2,300 Upm zentrifugiert, bis sich noch ca. 20 µl auf der Säule befinden. Die gereinigte Sonde wird nun durch Invertieren der Säule und durch eine Zentrifugation für 3 min bei 2,300 Upm in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wird die Sonde in einer Speedvac getrocknet. Dabei darf die Sonde nicht „übertrocknet“ werden. Die getrockneten Sonden werden nun in je 26 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert, 10 min bei RT inkubiert, anschließend miteinander gemischt und bei 90°C 2 min lang denaturiert. Der Objektträger wird mit der DNA-Seite nach oben in einer Hybridisierungskammer positioniert und mit einem Deckglas abgedeckt. Nun pipettiert man die denaturierten Sonden an den Rand des Deckgläschens, sodaß sich die Flüssigkeit unter das Deckgläschen saugt. Die Hybridisierungskammer wird versiegelt und ü.N. bei 65°C in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Am nächsten Tag wird der Objektträger in drei unterschiedlichen Puffern gewaschen. Waschpuffer 1 enthält 0,5 x SSC/0,01% SDS. Waschpuffer 2 0,06 x SSC/0,01% SDS und Waschpuffer 3 nur 0,06 x SSC. Es wird je 5 min in einem Objektträgerhalter auf einem Tischschüttler inkubiert. Anschließend wird 10 min lang bei RT in Dunkelheit mit 750 µl TNB-10% Ziegen Serum-Puffer (siehe Abschnitt 2.11) inkubiert, gefolgt von einem 1 min Waschschrift in TNT-Puffer (siehe Abschnitt 2.11). Als nächstes behandelt man den Objektträger 10 min lang mit 400 µl einer Anti-Fluorescein-HRP-Konjugatlösung (siehe Abschnitt 2.11) in Dunkelheit. Die HRP (engl.: horseradish peroxidase) ist der Enzymanteil des Konjugats, das die Anlagerung des Cyanin 3-markierten Tyramidamplifikationsreagenz katalysiert. Anschließend wird drei Mal je 1 min in TNT-Puffer gewaschen. Nun wird die DNA auf dem Objektträger mit 500 µl einer Cyanin-3 Tyramidlösung (siehe Abschnitt 2.11) 10 min lang in Dunkelheit inkubiert. Danach wird drei Mal je 5 min in TNT-Puffer gewaschen. Um die HRP zu inaktivieren, wird die DNA für 10 min mit 300 µl HRP-Inaktivierungslösung (siehe Abschnitt 2.11) behandelt. Nach

drei weiteren Waschschrritten je 1 min in TNT-Puffer, wird die DNA 10 min lang mit 400 µl einer Streptavidin-HRP-Konjugatlösung bei RT in Dunkelheit behandelt. Zum Abschluss inkubiert man die DNA auf dem Objektträger mit 500 µl einer Cyanin-5 Tyramidlösung wie vorher beschrieben. Nach den letzten drei Waschschrritten in TNT-Puffer je 5 min wird für 1 min in 0,06 x SSC abgospült und anschließend in einer Zentrifuge trocken zentrifugiert.

Nun kann der Array in einem GenePix 4000B Scanner (Axon Instruments) bei einer Auflösung von 10 µm gescannt werden. Der Scan sollte innerhalb 1 Woche nach der Färbung erfolgen, da sonst die Möglichkeit besteht, daß die Fluoreszenzintensitäten zu schwach werden.

3.9 Detektion neusynthetisierter adenoviraler DNA

3.9.1 Transfektion von pEGFP-C1 in BHK mit dem Nucleofector II

Um die optimalen Bedingungen für die Transfektion des hCAR-Rezeptors in BHK-Zellen zu determinieren, wird zunächst das GFP-exprimierende (grün fluoreszierendes Protein) Plasmid pEGFP-C1 mit Hilfe des Nucleofector II (Amaya) transfiziert. Unter Verwendung unterschiedlicher Transfektionslösungen, verschiedener Transfektionsprogramme sowie anschließender FACS-Analyse (siehe Abschnitt 3.9.2) werden die besten Bedingungen für die spätere Transfektion von hCAR in BHK-Zellen bestimmt.

Pro Transfektionsansatz werden 1×10^6 BHK-Zellen sowie je 2 µg pEGFP-C1 eingesetzt. Die Zellen werden nach der Ernte zunächst in eine PBS-d/0,5% BSA aufgenommen, um die Wirkung des Trypsins zu neutralisieren. Anschließend werden die Zellen in 100 µl Transfektionslösung V resuspendiert und mit 2 µg pEGFP-C1 versetzt. Dieses Gemisch wird in eine Transfektionsküvette überführt und im Nucleofector II plaziert. Nun wird je Ansatz ein anderes Transfektionsprogramm am Nucleofector ausgeführt. Danach werden die Zellen mit einer Plastikpipette aus der Küvette in 500 µl Transfektionsmedium (siehe Abschnitt 2.11) überführt und bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle werden 1×10^6 Zellen ohne Zugabe mit dem Nucleofector behandelt. Nachdem alle Transfektionen durchgeführt worden sind, werden die transfizierten Zellen in 6-Schälchen-Platten gegeben, die ebenfalls schon 1 ml Transfektionsmedium pro Schälchen enthalten. Die Platten werden nun bis zur weiteren Analyse im Zellkulturinkubator bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre gehalten.

3.9.2 FACS-Analyse der pEGFP-C1 transfizierten BHK-Zellen

Die transfizierten BHK-Zellen werden 24 h nach der Transfektion geerntet und 5 min mit einer Hettichzentrifuge EBA20 bei 300g sedimentiert. Der Überstand wird abgezogen und die Zellen werden in 500 µl FACS-Puffer (siehe Abschnitt 2.11) aufgenommen. Diese Lösung wird in FACS-Röhrchen überführt und im FACS-Gerät vermessen. Zur Analyse wird das Programm WinMDI verwendet.

3.9.3 Metabolisches Labeling pHCAR-transfizierter und Ad12-infizierter BHK-Zellen

BHK-Zellen werden mit pHCAR wie in Abschnitt 3.9.1 beschrieben transfiziert. Als Transfektionsprogramm wird Programm T20 festgelegt, welches die beste Transfektionseffizienz in Testexperimenten ergibt. 8 bzw. 14 h nach der Transfektion werden die Zellen mit 100 pfu Ad12 infiziert (siehe Abschnitt 3.2.1). 2 h p.i. wird das Inokulum abgenommen und 1,5 ml frisches Medium mit 100 µCi Orthophosphat³³ zugegeben, um die neusynthetisierte DNA radioaktiv zu markieren. 72 h p.i. werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 1500 Upm in einer Hettichzentrifuge (Rotina 48 R) werden die Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen und abermals zentrifugiert. Nun wird der Überstand abgenommen, und die Zellen werden in 3 ml Tris-Saline resuspendiert. Anschließend wird das Virus über einen CsCl-Gradienten wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben gereinigt. Nach der Zentrifugation in der Ultrazentrifuge werden von dem Gradienten mit Hilfe eines Austropfgerätes Fraktionen von je drei Tropfen gesammelt. 40µl dieser Fraktionen werden mit je 100 µl Szintillationslösung Rotozint gemischt und in einem Szintillationszähler Beta-Counter 1450 vermessen.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich zwischen produktiver und abortiver Infektion

Wie wirkt sich die Infektion menschlicher bzw. Hamsterzellen mit Adenovirus Typ 12 auf die Transkription der zellulären Gene aus? Im folgenden werden die Ergebnisse für eine produktive Infektion von HeLa-Zellen sowie für eine abortive Infektion von BHK21-Zellen dargestellt.

4.1.1 Virusproduktion

HeLa-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50 % mit 25 Pfu/Zelle Ad12 inokuliert. Nach 72 Stunden wurden diese Zellen geerntet und das Virus wie beschrieben isoliert (siehe Abschnitt 3.2). Anschließend wurde zunächst die DNA des Virus isoliert und gereinigt (siehe Abschnitt 3.2.6), um sicher zu stellen, daß es sich um Adenovirus Typ 12 handelt. Nach der Isolation der DNA wurde jeweils 1 µg der Virus-DNA mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *BamHI* und *PstI*) geschnitten, und die Fragmente werden auf einem 0,7 %-igen Agarosegel aufgetrennt (siehe Abb. 4.1).

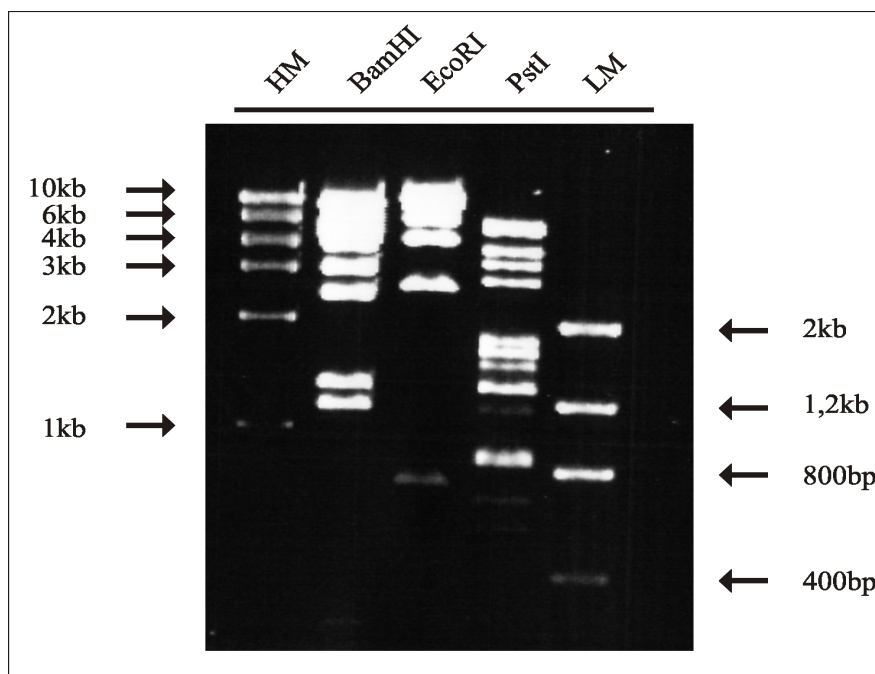


Abbildung 4.1: Restriktionsmuster von Ad12-DNA (*BamHI*, *EcoRI*, *PstI*), links und rechts davon sind DNA-Marker aufgetragen (HM, LM).

Ein Vergleich dieser Restriktionsmuster mit den authentischen Ad12-Mustern ergibt, kann man erkennen, daß es sich bei der isolierten DNA um Ad12-DNA handelt. Die Anzahl und Größe der Banden entsprechen denen, die man für diese DNA und die verwendeten Restriktionsenzyme erwartet. Jeweils rechts und links neben der zu untersuchenden DNA sind zwei DNA-Größenmarker aufgetragen worden. Bei dem linken Größenmarker handelt es sich um einen als HM bezeichneten Marker (englisch High Marker). Er umfasst einen Größenbereich von 1 kb bis 10 kb. Der linke Größenmarker LM (englisch Low Marker) umspannt den Bereich von 400 bp bis 2 kb. Bevor jedoch die einzelnen Experimente begannen, wurde das Virus auf seine Infektiosität überprüft. Es wurde der in Abschnitt 3.2.5 beschriebene Plaquetest durchgeführt. Dieser Test bestimmt den Virustiter sehr genau, jedoch ist es auch ein langwieriger Versuch, der bis zu 3 Wochen dauern kann. Nur wenn ein zufriedenstellender Virustiter bestimmt wurde, konnte das Virus weiter verwendet werden.

4.1.2 Isolierung und Kontrolle der RNA

Um die Auswirkungen einer produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12 auf die Expression der zellulären Gene zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit 25 Pfu/Zelle inokuliert, und die cytoplasmatische RNA dieser Zellen wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten während der Infektion isoliert. Dazu wurden die Zeitpunkte 24 h p.i. , 32 h p.i., 48 h p.i. sowie schein-infizierte Zellen gewählt. Schein-infizierte Zellen wurden genauso behandelt wie die infizierte, allerdings mit dem Unterschied, daß diesen Zellen kein Virus zugegeben wurde. Nach der Ernte der Zellen und der Isolation der cytoplasmatischen RNA, wurde diese mit DNase behandelt (siehe Abschnitt 3.5.2). Anschließend wurde die RNA durch Phenol-Chloroform-Behandlung extrahiert. Nach der Präzipitation wurde die Konzentration bestimmt. Um zu überprüfen, ob die RNA degradiert war, wurde je 1 µg auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Banden konnten nach einer Ethidiumbromidfärbung auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 4.2) zeigt ein typisches Bandenmuster isolierter RNA.

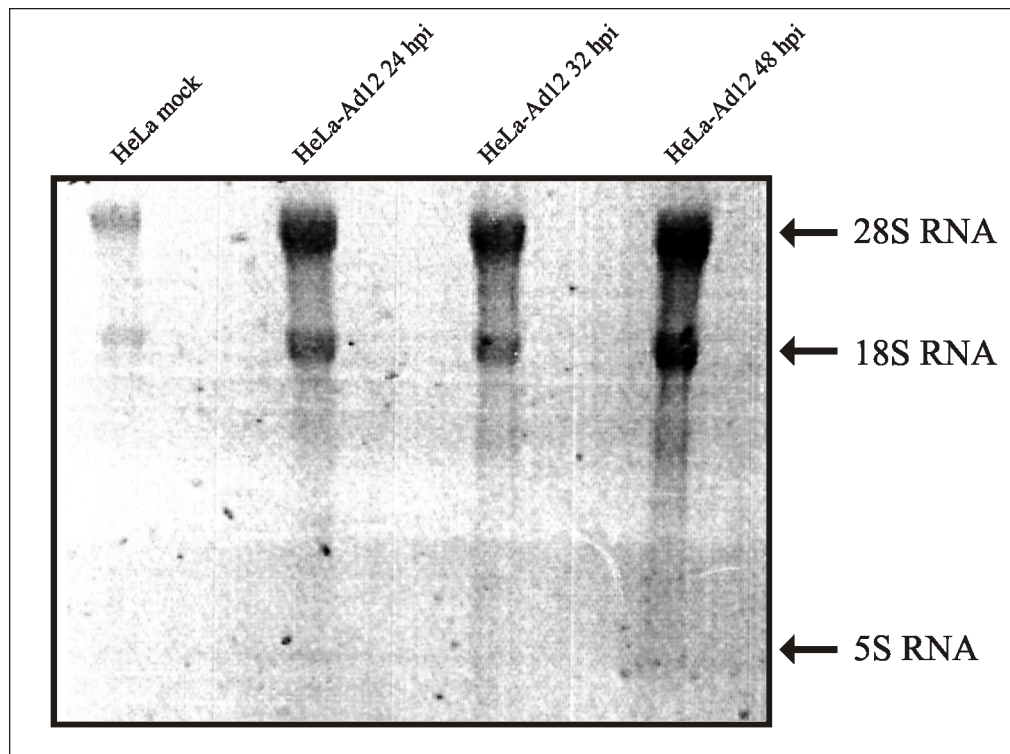


Abbildung 4.2: RNA aufgetrennt auf einem 1 %-igen Agarosegel.

Nach der Auftrennung sind vorwiegend drei Banden sichtbar. Es handelt sich hierbei um die unterschiedlichen ribosomalen RNAs. Die 5S RNA ist läuft im Gel am schnellsten, gefolgt von der 18S und der 28S RNA. Der leichte Schmier, der zwischen den einzelnen Banden zu sehen ist, beinhaltet die für die Experimente wichtigen mRNAs.

Nach dieser Überprüfung folgt eine weitere wichtige Kontrolle. Die RNA muss für die weiteren Schritte frei von DNA sein, um sicher zu stellen, daß möglicherweise zurückgebliebene DNA nicht zu Kreuzhybridisierungen auf den Arraymembranen führt, wodurch alle Ergebnisse verfälscht würden. Diese Kontrolle wird mittels einer RT-PCR durchgeführt. Dazu werden von jeder Probe zwei unterschiedliche Ansätze hergestellt. Ein Ansatz enthält alle Reagenzien, der andere Ansatz enthält keine Reverse Transkriptase (siehe Abschnitt 3.5.5). Sollte doch noch DNA in der experimentellen Probe vorhanden sein, würde man dies nach der Auftrennung auf einem 1,5 %-igen Agarosegel anhand der Banden erkennen. In solchen Fällen wurde die RNA nochmals mit DNase behandelt, und die gleichen Kontrollen wurden wiederholt. Abb. 4.3 zeigt das Ergebnis eines derartigen RT-PCR Experimentes mit vier isolierten HeLa-RNAs.

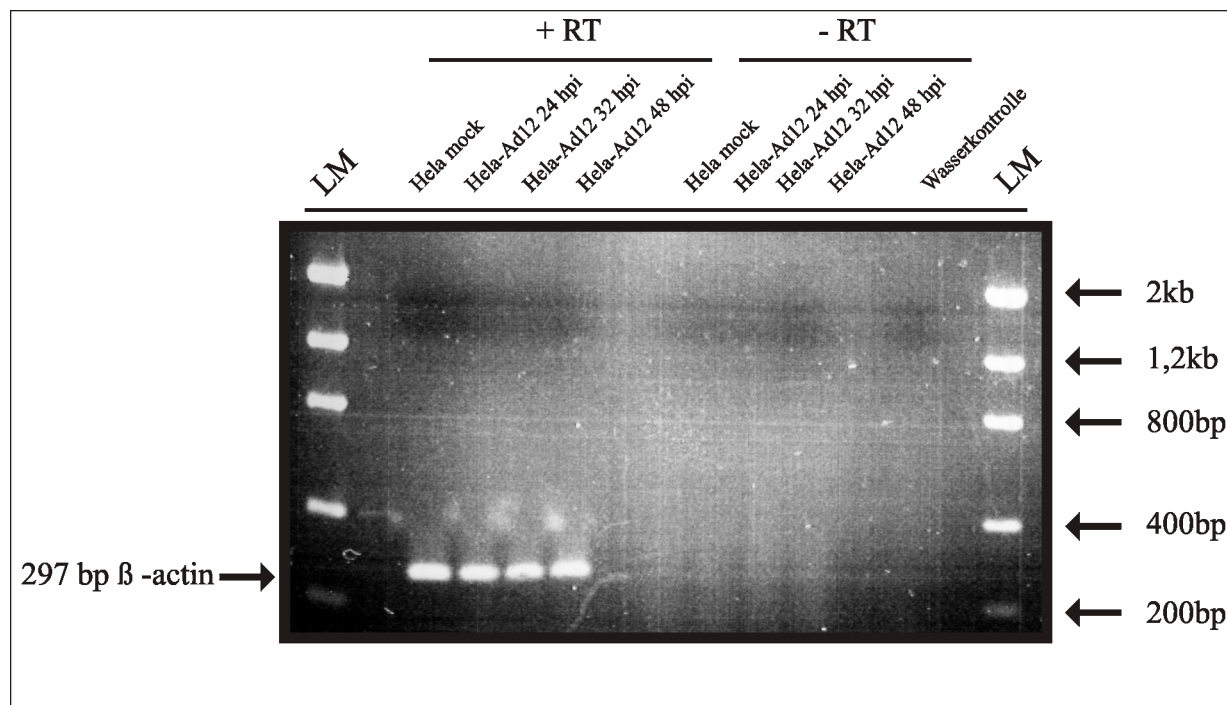


Abbildung 4.3: Kontrollexperimente durch RT-PCR unterschiedlicher HeLa-RNA Präparationen : Scheininfektion, 24 h p.i., 32 h p.i. und 48 h p.i.).

Zum einen kann man das Produkt der RT-PCR, die β -actin-Bande als interne Kontrolle auf der linken Seite erkennen: so erkennt man, daß vorhandene RNA effizient revers transkribiert wird. Diese Ansätze enthielten alle die Reverse Transkriptase. Auf der rechten Seite mit den Ansätzen ohne RT sind weder bei den Proben, die RNA enthalten, noch bei der Wasserkontrolle Signale zu erkennen. Als Größenmarker diente hier der Low Marker. Nachdem diese Kontrollen eindeutig belegten, daß die verwendeten RNA Präparationen frei von DNA waren, konnte mit den Array-Experimenten begonnen werden.

4.1.3 Untersuchung zur Auswirkung einer produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12: Übersichtsanalysen mit Nylonmembranen

Für die Untersuchung der produktiven Infektion von menschlichen HeLa-Zellen mit Ad12 wurden vier unterschiedliche Zeitpunkte während der Infektion gewählt, an denen die cytoplasmatische RNA der infizierten Zellen isoliert wurde: 24 h p.i., 32 h p.i., 48 h p.i. sowie RNA aus schein-infizierten Zellen. Als Arraymembran wurden die Lifegridarrays der Firma Incyte verwendet. Diese Membranen enthalten 8.400 menschliche Gene , von

denen circa 7.600 bekannte Gene sind. Die restlichen Gene sind sogenannte EST-Klone (englisch: Expressed Sequence Tag), das heißt diese DNA Abschnitte werden exprimiert, man kann ihnen jedoch noch keine Funktion zuordnen. Zusätzlich zu diesen Genen befinden sich 27 Hefegene als Kontrollen auf der Membran, um nachzuweisen, daß die Reverse Transkription erfolgreich verläuft. Alle Gene sind jedoch nicht einzeln, sondern doppelt auf die Membran aufgebracht worden. Somit befinden sich insgesamt circa 16.800 einzelne Punkte auf jeder Membran. Dieses doppelte Auftragen ermöglicht, falsch positive Signale zu erkennen. Wenn bei einem Gen nur eines der beiden möglichen Signale zu erkennen ist, wird dieses Signal bei Auswertung ignoriert. Die folgende Abbildung zeigt das Auftragungsschema einer solchen Membran.

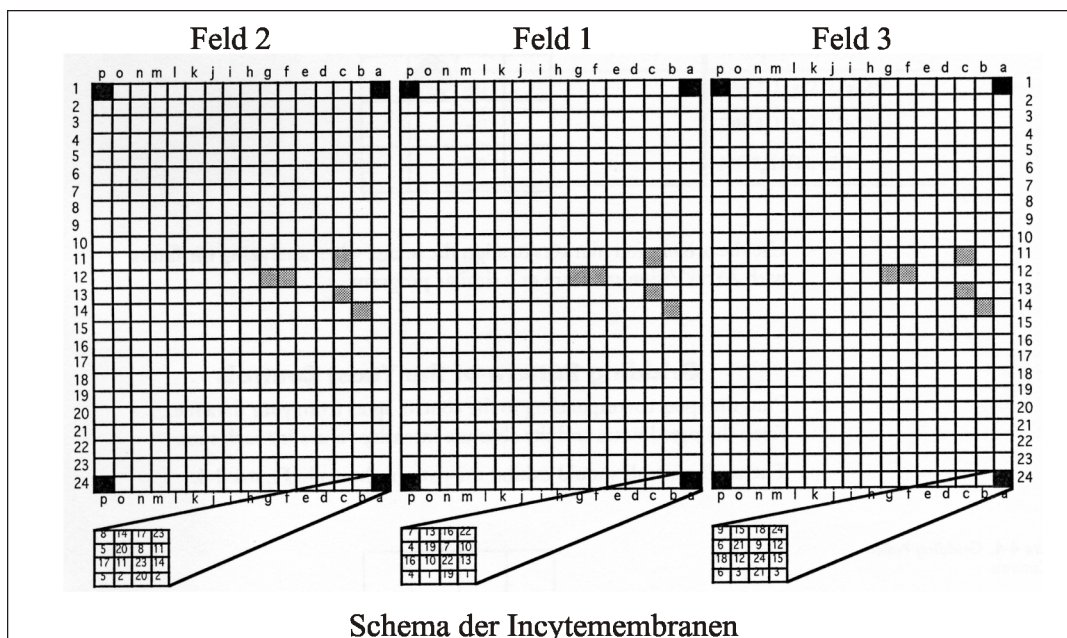


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung einer Lifegridmembran der Firma Incyte.

Jede Membran ist in drei Felder aufgeteilt. In den schwarz markierten Bereichen in den Ecken der Felder befinden sich neben menschlichen Genen die sogenannten Positionsmarker. Sie dienen der leichteren Orientierung auf der Membran während der Auswertung, da sie bei erfolgreicher Reverser Transkription ein sehr starkes Signal zeigen. In den grau schraffierten Quadraten sind die Hefekontrollgene aufgebracht. Zu jedem experimentellen Ansatz gibt man die entsprechende Kontroll RNAs (Hefegene und Positionsmarker) dazu. Im unteren Bereich des Schemas sind drei Quadrate vergrößert dargestellt. Wie man erkennen kann, sind die Quadrate nochmals in 16 kleine Felder unterteilt. In diesen 16 Feldern stehen Zahlen. Es gilt die Regel, gleiche Zahlen entsprechen der Position eines Gens innerhalb dieses vergrößerten Quadrats. Wenn man zum Beispiel das linke der drei vergrößerten Quadrate betrachtet, so befindet sich die Zahl 20 einmal in der untersten Reihe und noch einmal in der zweiten Reihe von

oben. Somit ergeben sich insgesamt 8 unterschiedliche Auftragungsmuster aller Gene. Dabei ist zu beachten, daß zwei Punkte für ein Gen niemals nebeneinander auf der Membran liegen. Auf diese Weise lassen sich die Positionen jedes Gens mit Hilfe des Koordinatensystems und des Auftragungsmusters eindeutig zuordnen. Es folgen die Ergebnisse einer produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12.

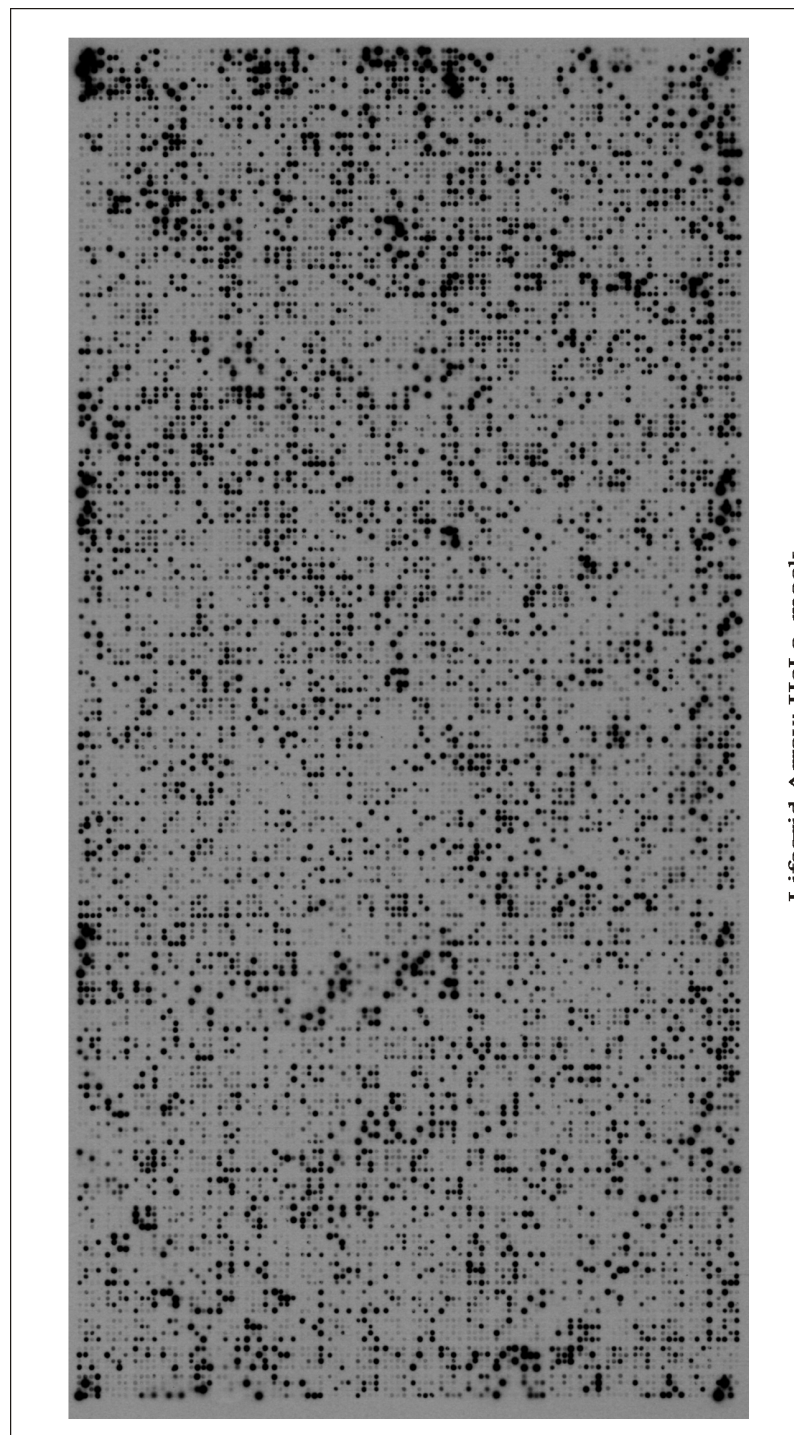


Abbildung 4.5: Lifegrid Array hybridisiert mit RNA aus schein-infizierten HeLa-Zellen.

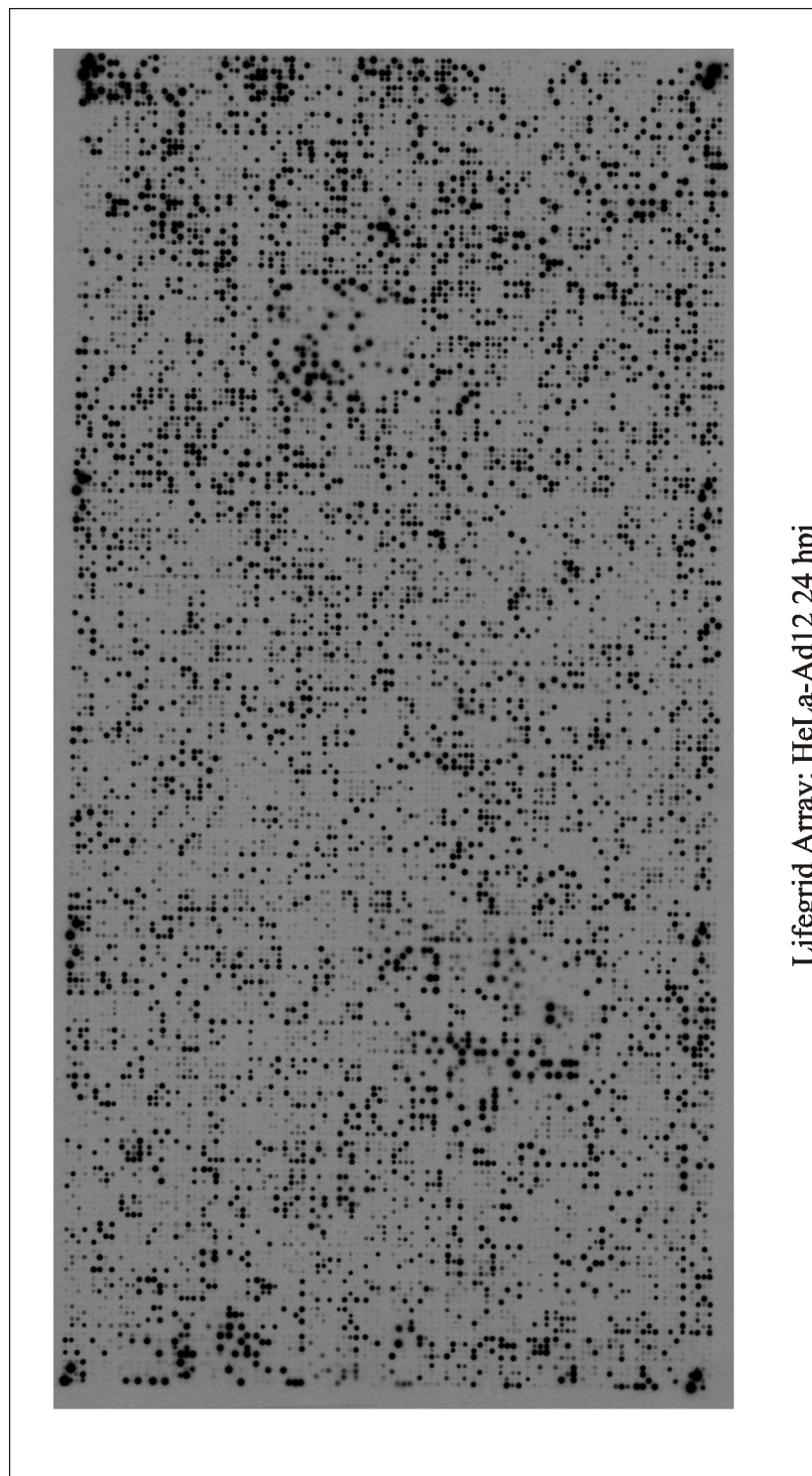


Abbildung 4.6: Lifegrid Array hybridisiert mit RNA aus HeLa-Zellen 24 Stunden nach der Infektion mit Ad12.

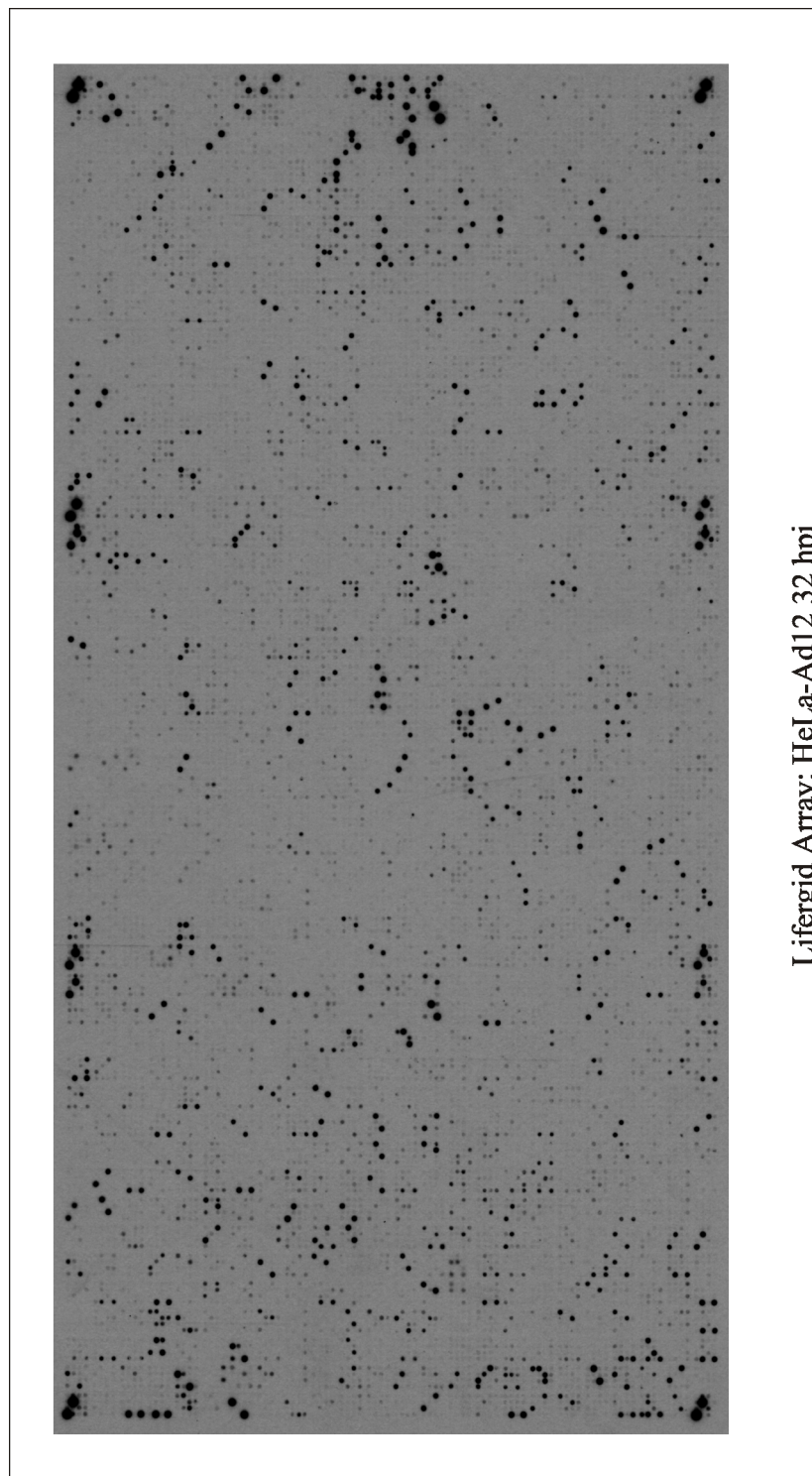


Abbildung 4.7: Lifegrid Array hybridisiert mit RNA aus HeLa-Zellen 32 Stunden nach der Infektion mit Ad12.

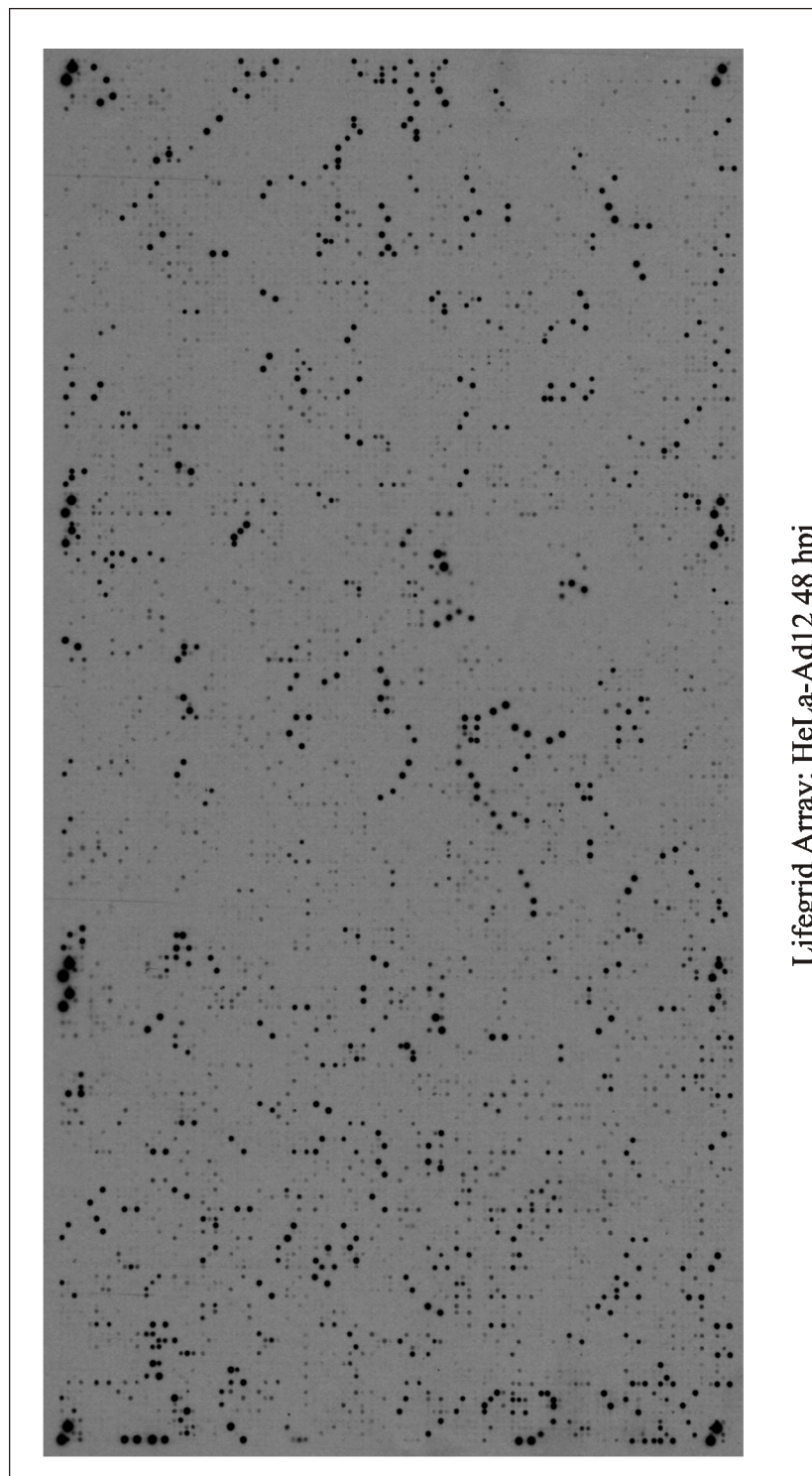


Abbildung 4.8: Lifegrid Array hybridisiert mit RNA aus HeLa-Zellen 48 Stunden nach der Infektion mit Ad12.

Bei schein-infizierten Zellen sind circa 90 % der Gene, die sich auf der Membran befinden, exprimiert (Abb. 4.5). Es gibt dabei unterschiedliche Stärken der Expression, sowie einige Gene, die nur sehr schwach exprimiert sind. Desweiteren kann man sehr gut die Positionsmarker in den Ecken der einzelnen Felder erkennen. Sie ergeben ein deutlich stärkeres Signal als die restlichen Gene auf der Membran. An diesem Bild ändert sich auch 24 h p.i. nur sehr wenig (Abb. 4.6). Es ist lediglich eine leichte Abschwächung im Gesamtbild der Expression zu erkennen, wobei aber das Muster der Expression gleich bleibt. Erst 32 h p.i. läßt sich ein rapider Abfall der Transkription der zellulären Gene feststellen (Abb. 4.7). Fast 90 % der Gene sind nach 32 Stunden der Infektion herunter reguliert worden. Allerdings sind auch einige Gene im Vergleich zum Muster aus schein-infizierten Zellen stärker exprimiert. 48 h p.i. ergibt sich ein ähnliches Bild wie 32 h p.i.. Viele Gene sind herunter reguliert, einige aber auch stärker exprimiert als schein-infizierte Zellen (Abb. 4.8). Eine genaue Aufstellung der am stärksten regulierten Gene kann man in den folgenden Tabellen finden.

Rang	Feld	Position	Muster	Intensität HeLa mock	Intensität HeLa 24hpi	Faktor	Genname
1	2	k1	6	105.729	238.015	2,25	Fasciculations- und Elongationsprotein zeta 1 (Zygin 1)
2	2	f18	2	90.285	193.604	2,14	Acide Phosphodiesterase
3	1	e5	7	107.886	225.030	2,08	Interleukin Enhancer Bindungsfaktor 3
4	2	n2	2	111.750	219.911	1,96	SMA 3
5	2	n4	5	130.593	254.708	1,95	Tumor Nekrose Faktor Superfamilie, Nr.10
6	1	o9	2	78.455	147.026	1,87	SHB Adaptor Protein
7	1	b5	3	84.360	156.729	1,85	Aktinbezogenes Protein, Untereinheit 3 (21kD)
8	1	f9	3	135.761	251.593	1,85	Pericentrioles Material 1
9	1	p12	8	132.282	245.038	1,85	Histidintriade Nukleotidbindendes Protein
10	2	o5	6	167.863	306.578	1,82	Mutiert in Colorektalen Karzinomen

Tabelle 4.1: Vergleich der Expressionsmuster von schein-infizierten HeLa-Zellen mit den Mustern der RNA aus Zellen 24 Stunden nach der Infektion mit Ad12.

Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht über die differenziell exprimierten Gene 24 h p.i. Neben den Positionen der Gene sind auch die Intensitätswerte der einzelnen Signale dargestellt. Das Verhältnis der Intensitäten ergibt den Faktor, um den das Gen stärker oder schwächer transkribiert wird. In diesem Fall sind die Gene dargestellt, die 24 h p.i. stärker exprimiert sind als in schein-infizierten Zellen (erkennbar in der Spalte: Faktor).

Im linken Bereich ist die Position des Gens auf der Membran angegeben und der Rang, den dieses Gen in dieser Auswertung erhält. Rechts daneben folgen die einzelnen Intensitäten der jeweiligen Gene, die gemessen wurden. Das entscheidende Kriterium hier ist jedoch der Faktor, der anzeigt, um wieviel ein bestimmtes Gen zu einem speziellen Zeitpunkt stärker exprimiert wird als zu dem Vergleichszeitpunkt. Wie aus den vorherigen Abbildungen deutlich wird, nimmt die Genexpression während der Infektion stark ab. Daher waren die Gene, die während der Infektion in ihrer Expression hoch reguliert wurden, von besonderem Interesse. Wie man Tabelle 4.1 entnehmen kann, sind 24 Stunden nach der Infektion nur wenige Gene um mehr als einen Faktor 2 in der Expression erhöht. Zu den Faktoren ist zu sagen, daß man einen Faktor 2 nicht mit bloßem Auge auf der Membran erkennen kann. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurden diese Gene außer Betracht gelassen, und nur Gene, die einen Expressionsunterschied von einem Faktor 5 oder mehr aufwiesen (auf der Membran erkennbar), herangezogen.

Rang	Feld	Position	Muster	Intensität HeLa mock	Intensität HeLa 32hpi	Faktor	Genname
							Eukaryotischer
1	3	l9	4	116.555	1.226.330	10,5	Translationsinitiationsfaktor 4
2	2	o5	6	167.863	1.523.680	9,07	Mutiert in Colorektalen Karzinomen
3	3	f10	1	169.171	1.391.188	8,2	Z-Band alternativ gespleißtes PDZ-Motiv
4	3	a8	5	186.412	1.523.546	8,1	ESTs
5	3	d10	2	167.674	1.323.674	7,8	KIAA0909 Protein
6	1	e8	3	172.563	1333710	7,7	Incyte EST
7	3	f15	1	215.290	1.616.070	7,5	Integrin, alpha L (Lymphocyt-assoziertes Antigen)
8	3	f20	3	186.310	1.383.313	7,4	ESTs
9	3	p3	7	169.082	1.243.283	7,3	Interferon-bezogener Entwicklungsregulator 2
10	3	h21	4	214.912	1.554.992	7,2	TLS-assoziertes Serin-Arginin Protein
11	2	p3	2	217.340	1.570.844	7,2	ESTs
12	3	h21	4	206.658	1.459.633	7	ESTs
13	2	p4	2	220.657	1.553.842	7	Incyte EST
14	2	k13	4	153.008	1.067.351	6,9	Interleukin-Rezeptor 3
15	3	k8	3	188.745	1.308.572	6,9	ESTs
16	3	f21	2	189.131	1.304.672	6,8	Incyte EST
17	3	d4	7	224.742	1.534.390	6,8	EST
18	2	k8	6	161.849	1.100.375	6,7	Pankreatisches Lipase-bezogenes Protein 1
19	3	c6	5	239.057	1.605.890	6,7	ESTs
20	3	b2	7	245.733	1.648.672	6,7	ESTs

Tabelle 4.2: Vergleich der Expressionsmuster von schein-infizierten HeLa-Zellen und 32 Stunden nach der Infektion mit Ad12.

Wenn man sich die entsprechenden Autoradiographien von HeLa-mock und HeLa-Ad12 32 h p.i. vergleicht, könnte man vermuten, daß alle Gene 32 Stunden nach der Infektion in der Expression herunter reguliert wurden. Wie jedoch die Daten in Tabelle 4.2 erkennen lassen, sind im Gegenteil eine Vielzahl von Genen im Vergleich zu scheininfizierten Zellen stärker transkribiert. Hier sind nur die ersten 20 Gene zur Veranschaulichung dargestellt, im ganzen handelt es sich jedoch um 61 Gene, die nach 32 Stunden der Infektion um mindestens einen Faktor 5 höher exprimiert sind als scheininfizierte Zellen. Das am stärksten transkribierte Gen ist der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4 mit einem Faktor von 10,5. Wie man in der folgenden Abbildung sehen kann, ist dieser Unterschied auch mit dem Auge gut zu erkennen.

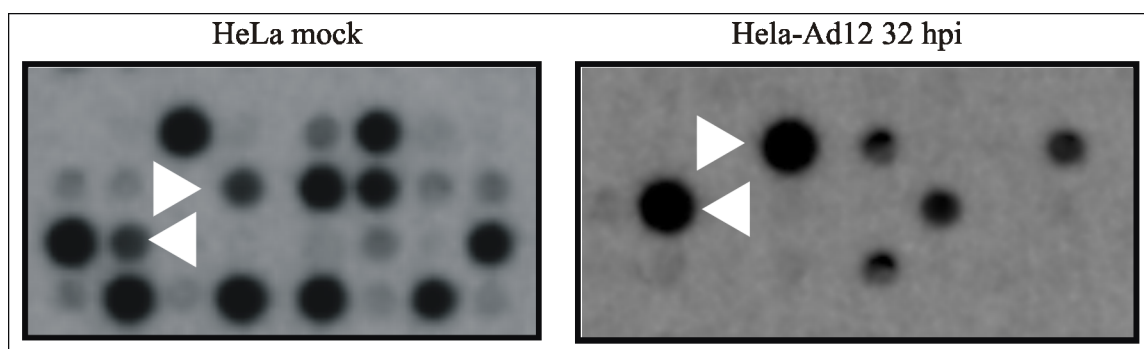


Abbildung 4.9: Vergrößerte Darstellung der Signale des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4. Für genaue Werte siehe Tabelle 4.2.

Man kann deutlich erkennen, daß dieses Gen 32 Stunden nach der Infektion mit Ad12 viel stärker exprimiert ist als in uninfizierten Zellen. Die meisten anderen Gene, die in der Abbildung dargestellt sind, sind jedoch 32 Stunden nach Infektion sehr stark herunter reguliert. Nur die beiden Signale in der rechten Bildhälfte sind 32 h p.i. ebenfalls stärker als in scheininfizierten Zellen.

Rang	Feld	Position	Muster	Intensität HeLa mock	Intensität HeLa 48hpi	Faktor	Genname
1	3	i17	2	8.540	254.239	29,7	ABL Gen, Exon 1B
2	2	n17	3	13.667	319.846	23,4	NBR 2
3	1	l6	8	21.336	294.847	13,8	KIAA0365 Genprodukt
4	3	o18	4	18.880	241.714	12,8	Ribonuklease P (38kDa)
5	1	k11	1	38.765	382.015	9,8	KIAA0264 Protein
6	1	e12	7	39.355	296.570	7,5	Spermienoberflächenprotein
7	1	l2	4	44.778	334.662	7,4	Inositol 1,4,5-Trisphosphat 3-Kinase
8	1	p7	4	45.184	336.334	7,4	ESTs
9	3	g1	5	49.745	359.632	7,2	G-Protein, Alpha-aktivierendes Polypeptid
10	3	k23	2	32.768	231.970	7	Komplemente Komponente 9
11	2	d9	3	51.354	360.471	7	H.s. Klon 23821
12	3	j23	4	95.127	629.961	6,6	CD68 Antigen
13	2	n17	2	57.443	377.874	6,5	Homeobox B2
14	1	l15	2	45.878	277.176	6	TTK Proteinkinase
15	2	f17	3	65.298	389.063	5,9	RNA-Polymerase II
16	3	l9	4	116.555	690.150	5,9	Incyte EST
17	3	m10	6	45.267	266.451	5,8	Acides 82 kDa Protein
18	3	p14	2	80.215	471.089	5,8	Zinkfingerprotein 44
19	3	g11	6	66.533	388.602	5,8	ESTs
20	1	c22	1	70.471	411.568	5,8	v-akt murine thymima virales Onkogenhomolog 2

Tabelle 4.3: Vergleich der Expressionsmuster von schein-infizierten HeLa-Zellen mit denen von Zellen 48 Stunden nach der Infektion mit Ad12.

Aus Tabelle 4.3 geht hervor, welche Gene nach 48 Stunden der Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12 stärker exprimiert sind als in uninfizierten Zellen. Auch nach 48 Stunden sind viele zelluläre Gene gegenüber schein-infizierten Zellen hoch reguliert. So ist das ABL-Gen in uninfizierten Zellen mit einer Intensität von 8.540 fast überhaupt nicht exprimiert. Nach 48 Stunden einer Ad12-Infektion jedoch steigt dieser Wert auf 254.239, was in einem Faktor von 29,7 resultiert. Insgesamt sind 30 Gene mit einem Verstärkungsfaktor von 5 oder mehr nach 48 Stunden zu erkennen.

Wie bereits erwähnt wird die Mehrzahl der Gene während der produktiven Infektion in ihrer Transkription herunter reguliert. Intensitäten und Faktoren für die herunter regulierten Gene sind hier allerdings nicht tabellarisch dargestellt. Es folgen nun zwei Beispiele, die bereits in der Einleitung erwähnt wurden: MHC Klasse I und c-Myc.

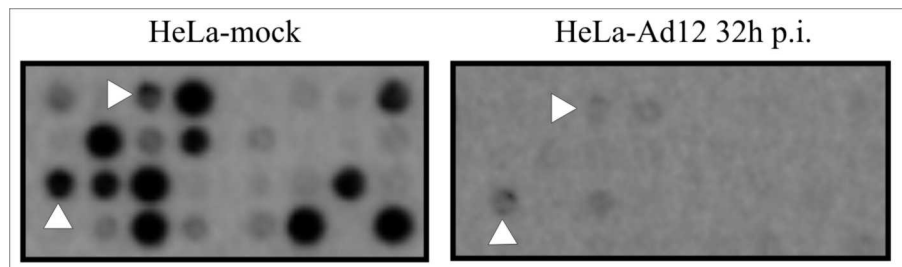


Abbildung 4.10: Vergrößerte Darstellung der Signale von c-Myc.

Wie man erkennen kann, ist das Signal von c-Myc nach 32 Stunden der Infektion fast nicht mehr zu erkennen, was sich auch in den Intensitätswerten ausdrückt. In uninfizierten Zellen erreicht c-Myc einen Wert von 197.344, nach 32 Stunden jedoch nur noch 10.241, was einen Faktor von 19,2 ergibt. Ähnlich verhält es sich mit dem MHC Klasse I-Gen. Hier liegt der Wert der mock-infizierten Zellen bei 239.226, der Wert nach 32 Stunden nur noch bei 16.109.

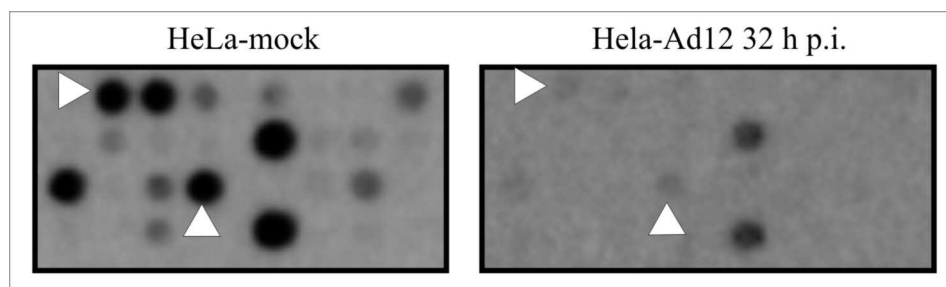


Abbildung 4.11: Vergrößerte Darstellung der Signale des MHC Klasse I-Gens.

Auch hier sieht man den deutlichen Unterschied zwischen beiden Zeitpunkten. Nach 32 Stunden sind neben den markierten Signalen nur noch die Signale von zwei weiteren Genen schwach zu erkennen. Alle anderen Gene dieser Membranregion werden nicht mehr transkribiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß während einer produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12 circa 90 % der zellulären Gene bis zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden in ihrer Expression herunter reguliert oder praktisch abgeschaltet werden. Allerdings gibt es eine relativ hohe Anzahl von Genen, die während der Infektion hoch reguliert werden und zwar im Zeitraum zwischen 24 und 32 Stunden nach der Infektion, da nach 24 Stunden noch keine wesentlichen Änderungen im Expressionsmuster festgestellt wurden. Nach 48 Stunden werden die Gene weiter herunter reguliert, was man an den Faktoren erkennen kann, die zu diesem Zeitpunkt sich in einem Bereich von 7 und

darunter bewegen.

4.1.4 Glasarrayuntersuchungen der produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12

In den anfänglichen Untersuchungen der produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Adenovirus Typ 12 gab es erste Hinweise darauf, daß bestimmte zelluläre Gene in einer späten Phase der Infektion in ihrer Transkription herauf reguliert wurden. Allerdings waren die Resultate noch nicht völlig zufriedenstellend. Um noch genauere und verlässlichere Ergebnisse zu erreichen, wurden die gleichen Experimente mit einem zusätzlichen früheren Zeitpunkt (12 h p.i.) mittels Glas-cDNA-Arrays und zugehöriger Computeranalyse durchgeführt. Die Infektionsexperimente wurden an drei verschiedenen Tagen jeweils mit frischem Inokulum wiederholt. Jede isolierte RNA bzw. revers transkribierter cDNA eines Infektionszeitpunktes wurde mit der RNA scheininfizierter Zellen auf einem Glasarray hybridisiert. Gleichzeitig wurde für jeden Infektionszeitpunkt, wie im Methodenteil erklärt, ein Dyeswapexperiment durchgeführt. Somit ergibt sich eine Gesamtzahl von 24 Glasarrays, die für diese Experimente verwendet wurden.

Nach Hybridisierung, Inkubation mit Antikörpern und den jeweiligen Waschschrritten wurden die fluoreszierenden Signale Arrays mit Hilfe der Software Genepix 4.0 quantifiziert. Abb. 4.12 zeigt einen stark vergrößerten Ausschnitt eines Glasarrays, der mit dieser Software bearbeitet wird.

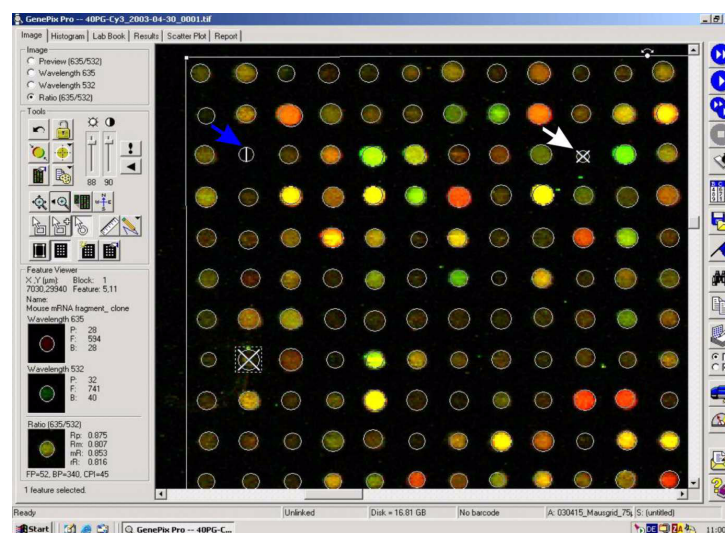


Abbildung 4.12: Beispiel für die Auswertung eines Glasarrays mit Hilfe der Analysesoftware Genepix 4.0. Weißer Pfeil: Schlechter Spot; Blauer Pfeil: Signal nicht vorhanden.

Das Programm erstellt um jedes Signal automatisch einen Kreis. Diese Funktion des Programms ist jedoch nicht zu 100% akkurat. Um sicher zu gehen, daß alle von der Software erstellten Bereiche korrekt erfaßt werden, kontrolliert man diese durch visuelle Analysen und verändert sie gegebenenfalls. Desweiteren hat man die Möglichkeit, bestimmte Signale besonders zu kennzeichnen. Normale Kreise stehen für gute Signale. Nicht homogene oder unförmige Signale markiert man als schlecht (siehe Abb. 4.12 weißer Pfeil). Nicht vorhandene Signale markiert man wie der blaue Pfeil in Abb. 4.12 zeigt. Die aus der Quantifizierung gewonnenen Daten werden dann in die statistische Analysesoftware „R“ eingelesen. „R“ wurde ursprünglich von Robert Gentleman und Ross Ihaka von der Universität Auckland, Neuseeland geschrieben und wird bis heute von anderen Programmierern weiterentwickelt. Die folgenden Darstellungen (Abb. 4.13 - Abb. 4.18) stammen aus diesem Programm und stellen den Verlauf des Normalisierungsprozesses der einzelnen Experimente dar. Es sind nur die Experimente zwischen 24 h p.i. und 48 h p.i. gezeigt.

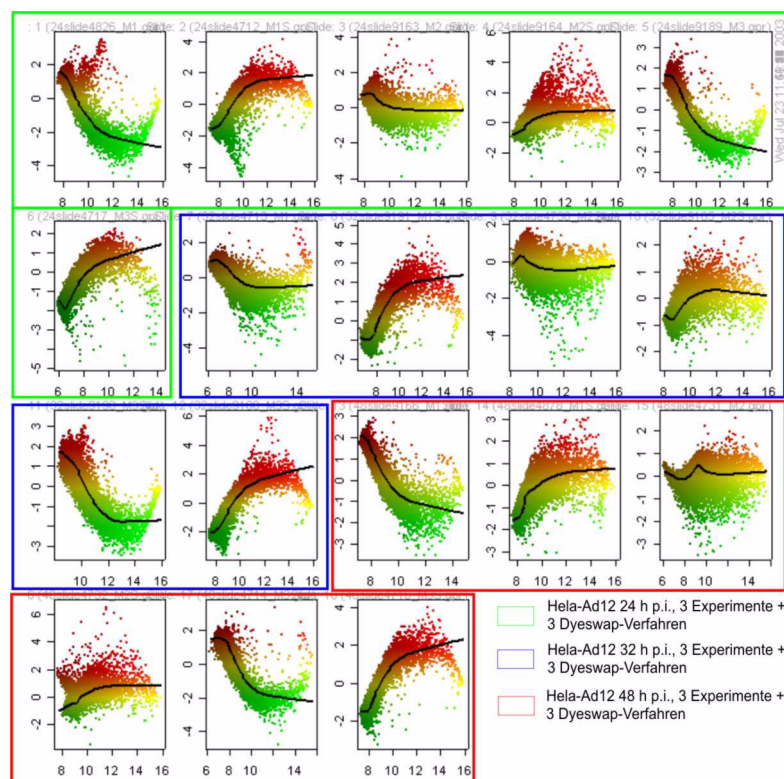


Abbildung 4.13: M-A-Plot aller Punkte, nicht normalisiert.

Abb. 4.13 zeigt einen sogenannten M-A-Plot. Das „M“ steht dabei für das mittlere Verhältnis zwischen den roten und grünen Signalen und ist auf der Y-Achse aufgetragen. Liegt ein Signal im roten Bereich über der schwarzen Linie, so ist dieses Gen in diesem

Fall in der Transkription hoch reguliert. Genau entgegengesetzt verhält es sich mit den grünen Signalen. Gelbe Signale entsprechen Genen, die sich in ihrer Transkription kaum verändert haben. Es ist zu beachten, daß es sich bei jedem zweiten der dargestellten Experimente um ein Dye-swap-Verfahren handelt. Somit sind in diesen Fällen die roten und grünen Signale vertauscht. Die Dye-swap-Experimente lassen sich auch sehr gut an den im Vergleich zu den „normalen“ Experimenten entgegengesetzt verlaufenden schwarzen Linien erkennen. Das „A“ steht für die Intensität der jeweiligen Signale (X-Achse), d.h. je weiter rechts sich ein Signal auf der X-Achse befindet, desto stärker war das Signal auf dem Array.

In Abb. 4.13 sind alle Punkte aufgetragen, die sich auf den Arrays befinden, d.h. auch die Signale, die als nicht vorhanden oder schlecht markiert wurden. Die grün umrahmten Diagramme entsprechen den drei unabhängigen Experimenten, in denen die cDNA von HeLa-Ad12 24 h p.i. mit cDNA schein-infizierter HeLa-Zellen verglichen wird. Bei den Diagrammen, die blau umrandet sind, handelt es sich um HeLa-Ad12 32 h p.i./HeLa schein-infiziert, und der rote Rahmen bezeichnet die Experimente zum Zeitpunkt 48 h p.i.. Desweiteren handelt es sich um Rohdaten ohne jegliche Art von Normalisierung. Um verlässliche Resultate zu erhalten und unterschiedliche Experimente miteinander vergleichen zu können, müssen die Daten normalisiert werden. Es besteht die Möglichkeit, daß die Inkorporation der fluoreszenzmarkierten Nukleotide in den durchgeführten Experimenten unterschiedlich effektiv war. Normalisieren bedeutet, die daraus resultierenden unterschiedlich starken Signale aneinander anzugleichen. Die Statistiksoftware „R“ erkennt die Diskrepanzen der unterschiedlichen Intensitäten und gleicht sie aus.

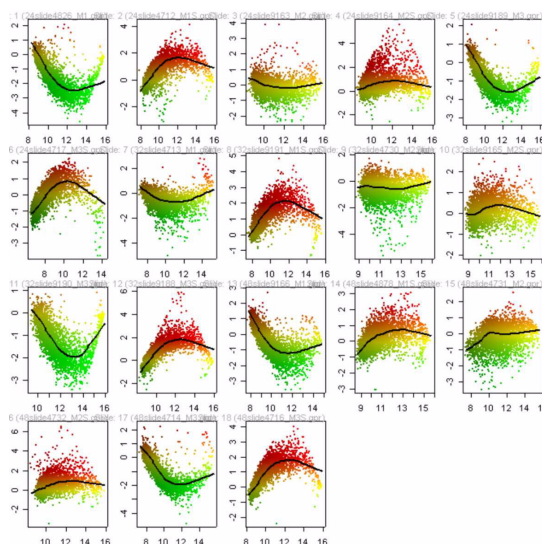


Abbildung 4.14: M-A-Plot aller guten Punkte, nicht normalisiert.

In Abb. 4.14 sind nur die als gut klassifizierten Signal aufgetragen. Was man hier erkennen kann, sind die bananenförmigen Kurven, die durch die Punkte gelegt sind. idealerweise würde man eine Gerade erwarten, die sich um den Nullpunkt bewegt. Allerdings sind die Daten auch in diesem Fall noch nicht normalisiert worden.

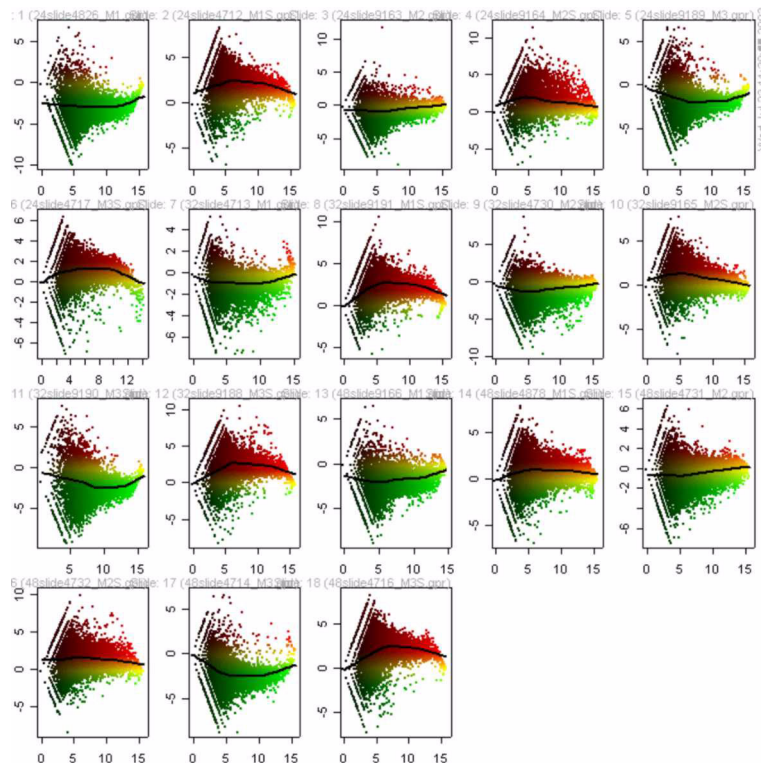


Abbildung 4.15: M-A-Plot aller Punkte, nicht normalisiert, Hintergrund abgezogen.

Abb. 4.15 zeigt den M-A-Plot aller Punkte, wo nun der Hintergrund abgezogen wurde. Was heisst dies? Bei Arrayexperimenten besteht immer die Möglichkeit, daß nicht alle überschüssige Fluoreszenz, die vielleicht unspezifisch auf dem Objektträger gebunden hat, durch die Waschstreps entfernt wurde. Mit „R“ hat man die Möglichkeit, diesen Hintergrund zu entfernen. Den Erfolg dieser Maßnahme kann man deutlich an den weniger gekrümmten schwarzen Kurven erkennen. Im linken Bereich jedes Plots kann man nun diagonal verlaufende rot un grün markierte Punkte erkennen. Das liegt daran, daß die Intensitätswerte dieser Signale unterhalb der Intensität des Hintergrunds liegen. Diese Punkte fallen in der weiteren Bearbeitung weg, werden aber in diesem Plot noch angezeigt. Auch in dieser Darstellung wurden die Daten noch nicht normalisiert.

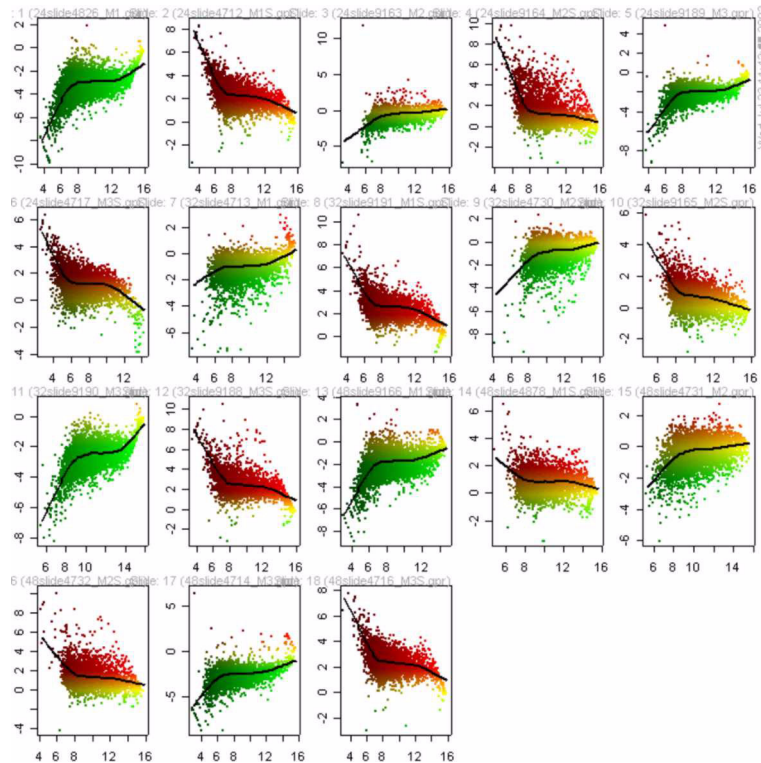


Abbildung 4.16: M-A-Plot aller guten Punkte, nicht normalisiert, Hintergrund abgezogen.

Abb. 4.16 zeigt die „bereinigte“ Form der vorherigen Darstellung. Hier sind nur die guten Werte berücksichtigt, von denen der Hintergrund abgezogen wurde, jedoch noch keine Normalisierung stattgefunden hat. Die in Abb. 4.15 beschriebenen Linien sind zum größten Teil verschwunden. Zwar sind die Regressionsgeraden im Vergleich zur vorherigen Abbildung weniger idealisiert, wie man sie realistisch erwarten würde. Dieser Zustand wird jedoch durch die nun folgende Normalisierung ausgeglichen.

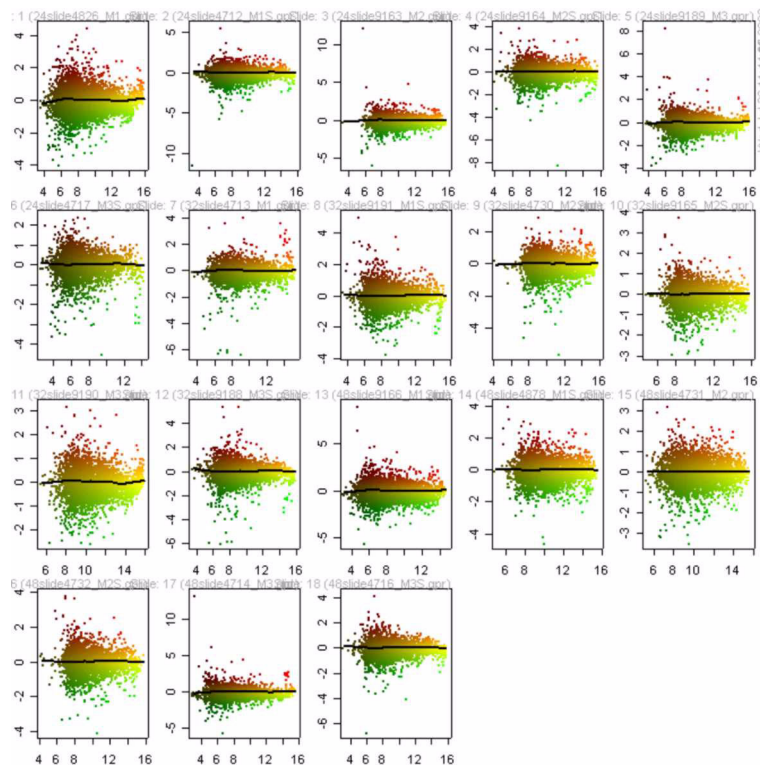


Abbildung 4.17: M-A-Plot der „gut“ markierten Punkte, Print-Tip normalisiert, Hintergrund abgezogen.

In Abb. 4.17 erkennt man die Auswirkung des Normalisierungsprozesses. Alle Signale gruppieren sich um den Nullpunkt und differenziell regulierte Gene kann man als Ausreißer ober- und unterhalb der Regressionsgerade oder *Lowess fit*-Kurve (siehe unten) erkennen. Wie kommt diese Veränderung zustande? Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Daten eines Arrays zu normalisieren. Die einfachste Methode der Normalisierung ist die sogenannte globale Normalisierung. Hierbei wird einfach die gesamte Intensität eines Arrays über alle Bereiche analysiert. Gibt es in bestimmten Regionen des Objektträgers hellere oder dunklere Bereiche, werden diese entsprechend verändert, um nach der Normalisierung ein gleichwertiges Intensitätsniveau über dem gesamten Array zu haben. Dies ist jedoch eine sehr einfache Art, die Daten eines Arrays zu normalisieren, die nicht zu sehr exakten Ergebnissen führt. Daher wird diese Methode heutzutage auch nicht mehr angewendet. Eine andere Möglichkeit der Normalisierung von Microarraydaten ist die *Lowess*-Normalisierung. Welches Prinzip steht hinter diesem Begriff? Bei Microarrayexperimenten, in denen zwei unterschiedlich farbige Fluorochrome benutzt werden, kann diese Form der Normalisierung angewendet werden. Das Verhältnis (*ratio*) zwischen rotem und grünen Signal, wird logarithmisch umgerechnet und ein sogenannter *Lowess-fit*-Faktor ($c(A)$) wird davon nach der Formel

abgezogen:

$$\log\left(\frac{R}{G}\right) = \log\left(\frac{R}{G}\right) - c(A)$$

Man kann diese Formel nun allgemein auf den gesamten Array anwenden, oder, wie in diesem Falle, die sogenannte Print-Tip Normalisierung benutzen. Das Auftragsmuster der verwendeten Microarrays besteht aus insgesamt 48 Feldern. In jedem Feld sind 18 x 18 Punkte aufgetragen. Print-tip bedeutet, dass die *Lowess* Normalisierung für jedes der 48 Felder separat durchgeführt wird. Somit wird eine noch höhere Genauigkeit bei der Normalisierung erreicht.

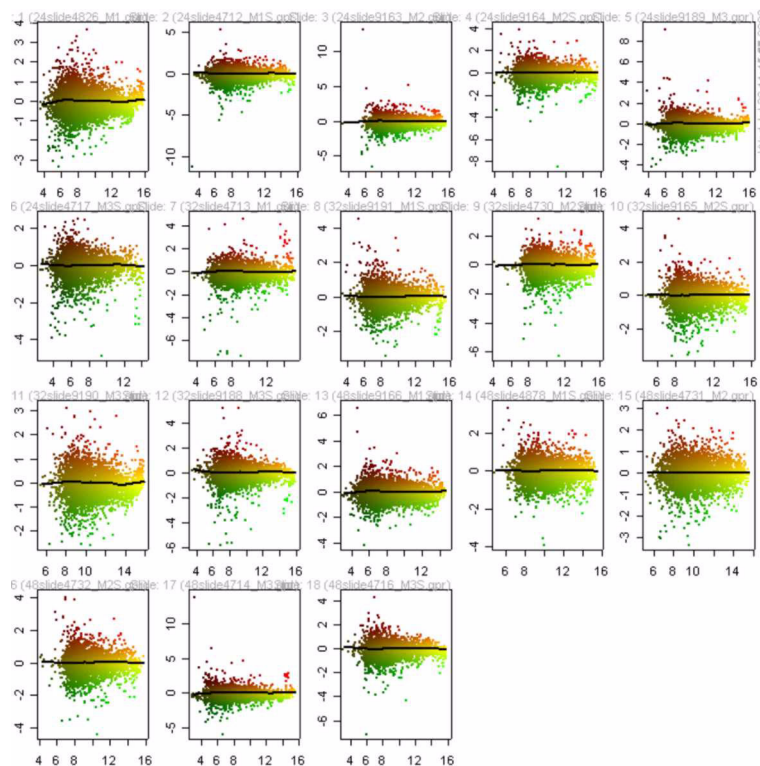


Abbildung 4.18: M-A-Plot der guten Punkte, Hintergrund abgezogen, Print-tip normalisiert, Scale normalisiert.

Abb. 4.18 zeigt das Endresultat des Normalisierungsprozesses. Es wurde aber noch ein weiterer Schritt durchgeführt. Bei der *Scale* Normalisierung werden nun alle verwendeten Microarrays analysiert und gegebenenfalls angeglichen, um sie miteinander vergleichen zu können. Wie man sieht, gruppieren sich alle Signale um die *Lowess*-Kurve, die nun fast eine Gerade geworden ist. Die stark regulierten Gene kann man

ober- und unterhalb dieser Geraden erkennen.

4.1.5 Identifikation biologisch signifikanter Gene

Nach der Normalisierung der Rohdaten können diese jetzt ausgewertet werden. Diese Bewertung erfolgt mit Hilfe eines Excel-Plugins, welches SAM (englisch: Significance analysis of microarrays) heisst. Die Daten werden in einer bestimmten Art sortiert und dann als Ausgangsmaterial in SAM eingegeben. Welche Werte wurden mit einbezogen? Nur Gene, die in 16 von 18 Fällen ein Signal auf dem Array zeigten, werden verwendet. Das bedeutet, daß bei diesem Ansatz nur die differenzielle Genexpression für die Gene festgestellt wurde, die während des untersuchten Infektionszeitraums exprimiert wurden. Gene, die z.B. schon nach 24 oder 32 h p.i. bereits abgeschaltet sind, fallen aus der Auswertung heraus. Vor- und Nachteile dieses Systems werden noch diskutiert. Abb. 4.19 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer solchen Analyse.

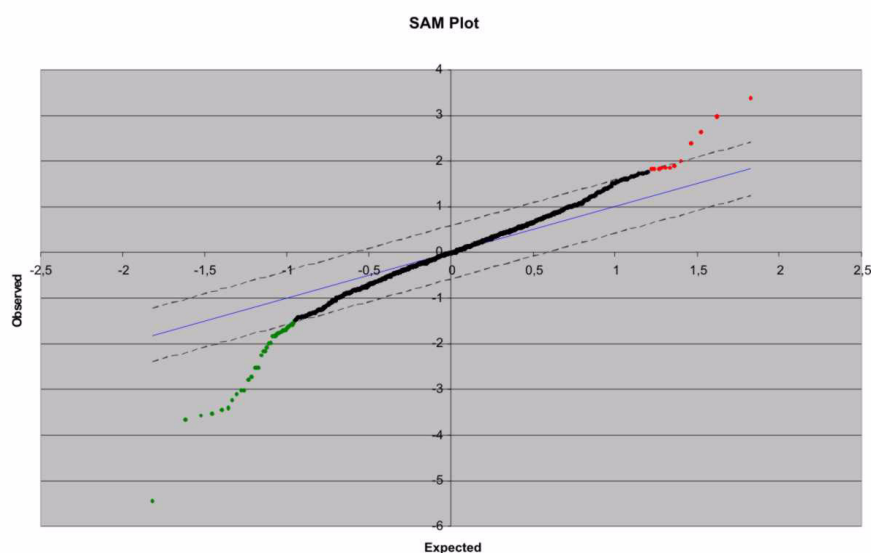


Abbildung 4.19: Beispiel für einen SAM Plot (HeLa-Ad12 32 h p.i.).

Wie man erkennen kann, sind alle Gene in einer Linie angeordnet, die an den Enden in eine rote und grüne Kurve übergeht. Die farbigen Punkte sind die signifikant regulierten Gene (grün: runter reguliert; rot: hoch reguliert). Desweiteren kann man zwei dünn gestrichelte Linien erkennen. Nach der Auswertung hat man die Möglichkeit, diese Linien in ihrer Breite zu verändern. Das heißt, man kann den Bereich der regulierten Gene erweitern oder verkleinern. Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß man die sogenannte *false discovery rate* erhöhen oder verringern kann. In den hier gezeigten

Experimenten liegt diese Rate bei 1,5%. Das bedeutet, daß man sich zu 98,5% sicher sein, daß die farbig markierten Gene (siehe Abb. 4.19) auch wirklich differenziell exprimiert werden.

Tabelle 4.4: Veränderungen der transkriptionellen Aktivitäten nach der Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12 im Vergleich zu schein-infizierten Zellen.

Kategorie	Clone ID	Gen	Genname	Faktor der Expressionsunterschiede im Vergleich zu mock-infizierten HeLa-Zellen			
				12 h p.i.	24 h p.i.	32 h p.i.	48 h p.i.
Immunantwort	742132	G1P2^b	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	24,3	1.0*	1,5	1,2*
	289496	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	9,4	-1.1	1,3	1,2
	823696	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	8,5	NSD^a	NSD	NSD
	530185	CD83	CD83 antigen	-1,7	-3,2	-1,2	-1,6
	627114	KLRC2	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2	NSD	-3,3	-1,8	-1,8
	310406	IL6	interleukin 6	-1.7	-3.8	NSD	-3.7
Signaltransduktion	51825	RIS	Ras family member Ris	NSD	1.1*	2,4	1,7
	1257170	PDE2A	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	1.3*	1,5	1,8	1.3*
	241530	EPHA2	EphA2	1.0*	-2,6	-3	-2,3
	626343	SH3BP5	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)	-1,6	-1,3	NSD	1,4
	1606557	FHL2	four and a half LIM domains 2	-1,9	-1.1*	-1.5*	-1.2*
	293715	RAB1A	member RAS oncogene family	1.0*	-1.2*	-1,6	-1,2
	789376	TXNRD1	thioredoxin reductase 1	-1,7	-1.2*	-1.2*	-1,4
	1358393	MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	-1,3	-1,9	-2,6	-2,1
Transkription	293339	SNAI2	snail homolog 2 (Drosophila)	1,6	-1.1*	NSD	-1,1
	949971	ATF4	activating transcription factor 4	1.0*	1.0*	1,8	1,9
	26568	EGR3	early growth response 3	1.0*	-1.3*	-1,8	-1,6
	299360	FUBP1	far upstream element (FUSE) binding protein 1	1.0*	-1.1*	-1,5	-1.3*
	770910	ELF3	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor)	-1,7	1.0*	1.1*	1.0*
	300482	FUBP3	far upstream element (FUSE) binding protein 3	-1.2*	-2.0*	-1,6	1.0*
	309864	JUNB	jun B proto-oncogene	1,4	-2,4	-2,3	-2
	309893	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	1.1*	-3,4	-3,5	-2,8
	340734	NFKBIA	nu. fac. of κ light polypep. gene enhancer in B-cells inhibitor	-1.1*	-3,3	-2,1	-1,7
	626716	ELL2	ELL-related RNA polymerase II, elongation factor	1.2*	-1.4*	-1,6	-1.3*
	682529	NFKB2	nu. fac. of κ light polypep. gene enhancer in B-cells 2	1.0*	-1,8	-1.1*	1.0*
	868575	DSIP1	delta sleep inducing peptide, immunoreactor	1.1*	1.6*	2,3	2
	884438	NFE2L2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	-1,4	-1,4	-1.5*	-1,5
898312	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	-1,2	-1,8	-1.3*	-1.1*	
Zellzyklus	2422905	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	-2	1,4	1.3*	1,4
	199371	CCND1	cyclin D1	-1.6*	-1.3*	-3,4	-2,3
	855949	CCNK	cyclin K	-1,6	NSD	NSD	-1,7
	279670	BCAR3	breast cancer anti-estrogen resistance 3	1,4	-2,2	-1.7*	-1,7
	795877	SNK	serum-inducible kinase	1.1*	-2,9	-2,8	-2,8
Apoptose	840776	SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase	-1,8	-1.4*	-1.3*	-1.1*
	3033304	MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	-1,1	-1,7	-2	-1,9
	810724	IER3	immediate early response 3	-2	-3,3	-2,5	-2,4
	1759582	TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	-1.2*	-1,5	-2,4	-3,5
Chromatinstruktur	290841	HIST1H2BK	histone 1, H2bk	1,8	-1.1*	1.2*	1.5*
	343744	H1F0	H1 histone family, member 0	-1,4	-2,2	NSD	NSD
	1836558	HIST1H2AE	histone 1, H2ae	-1,5	NSD	NSD	NSD
	701089	HIST1H4B	histone 1, H4b	-2	NSD	NSD	NSD
Zellstruktur	291880	MFAP2	microfibrillar-associated protein 2	NSD	-1,6	-1.1*	-2,5
	378488	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	NSD	-3,8	-6,1	-7
	814546	PSCD1	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1	NSD	-2,1	-2,1	-1.8*
	897768	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1	-1.3*	-1,9	-1,8	-1.4*
	Rnd3	Rnd3	Rnd3	1.1*	-2,3	-2,6	-2,2
	183602	KRT14	keratin 14	2,2	1.0*	-1,4	-1,9
	810131	KRT19	keratin 19	2,1	-1.1*	-1,5	-2
	841415	EPLIN	epithelial protein lost in neoplasm beta	-1,7	-2	NSD	NSD
	2180765	SDCBP	syndecan binding protein (syntenin)	-1.1*	-2,6	-2,8	-1,9

* Hohe Variation mit einem **Koeffizienten der Variation (CV)** > 90%

^a Kein Signal auf dem Array erkennbar.

^b Fettgedruckte Einträge wurden näher untersucht.

Kategorie	Clone ID	Gen	Genname	Faktor der Expressionsunterschiede im Vergleich zu mock-infizierten HeLa-Zellen			
				12 h p.i.	24 h p.i.	32 h p.i.	48 h p.i.
Zell-metabolismus	511633	RIG-I	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide	5,1	NSD	NSD	NSD
	135449	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	-1,2	-1,2*	-1,6	-1,1*
	80399	SFRS1	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2)	1,0*	-1,2	-1,6	-1,2*
	358457	HNRPH1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	-1,3*	1,0*	-1,6	-1,3
	626531	NSAP1	NS1-associated protein 1	-1,2*	1,0*	-1,6	-1,3
	898265	SFRS5	splicing factor, arginine/serine-rich 5	-1,3*	-2,5	-3,2	-2,4
	825470	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	-1,2*	-1,1*	1,6	1,3
	2499237	SERPINB5	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 5	NSD	1,0*	-1,1*	-1,6
	1474684	EFNA1	efrin-A1	-2,0*	-3,7	-2,9	-3,2
	82676	ANPEP	aminopeptidase N	-1,1*	1,1	1,9	1,8
	784589	MMP15	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	2,8	NSD	NSD	NSD
	252515	KYNU	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	-1,7	NSD	NSD	NSD
	810454	BACE2	beta-site APP-cleaving enzyme 2	-2,2	1,1*	1,1*	1,2
	2496262	NPR3	natriuretic peptide receptor C	1,4	1,0*	-1,1*	-1,5
	83605	CPS1	carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	-2	-1,1*	1,2	1,5
	796646	ODC1	ornithine decarboxylase 1	-1,1	-1,4	-1,6	-1,4
	525221	ALDH3A1	aldehyde dehydrogenase 3 family, memberA1	NSD	1,0*	1,9	1,8
	85259	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	-1,7	-2	-2,8	-2,1
	841689	ATP6IP1	ATPase, H+ transporting, lysosomal interacting protein 1	1,0*	1,0*	1,6	1,4
	626967	ALPI	alkaline phosphatase, intestinal	-2,3	NSD	NSD	NSD
	810711	SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	-1,7*	-1,1*	1,6	2,1
	897733	SLC38A2	solute carrier family 38, member 2	-1,6*	-1,5	-1,1*	-1,2
	877613	DCTN1	dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila)	1,0*	1,1*	1,8	1,3*
	1639732	PRKACG	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, gamma	1,0*	-1,9*	-1,7	-1,4*
	1574926	CYP2S1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1	NSD	1,4*	1,9	1,5
	825295	LDLR	low density lipoprotein receptor	-1,4	-1,7*	-1,4	NSD
	2448778	CTSF	cathepsin F	1,1*	1,2*	2,6	2,2

* Hohe Variation mit einem **Koeffizienten der Variation (CV)** > 90%

^a Kein Signal auf dem Array erkennbar.

^b Fettgedruckte Einträge wurden näher untersucht.

Tabelle 4.4 zeigt eine Zusammenfassung der signifikant regulierten Gene, die mit Hilfe von SAM identifiziert wurden. Aufgetragen sind neben der Klon Identifizierung und den Gennamen auch die Faktoren, um die sich die Transkription im Vergleich zu schein-infizierten HeLa-Zellen verändert haben. Von 7.500 untersuchten Genen sind insgesamt 72 zelluläre Gene in ihrer transkriptionellen Aktivität verändert. Neben Immunantwort und Transkription sind auch weitere Gengruppen wie Gene des Zellzyklus, der Signaltransduktion oder der Apoptose betroffen. In der zuerst genannten Gruppe findet sich das Gen, welches die stärkste Veränderung nach oben durchgemacht hat: G1P2. 12 h p.i. ist es um den Faktor 24,3 stärker exprimiert als in uninfizierten Zellen. Allerdings fällt die Transkription zu allen anderen untersuchten Zeitpunkten der Infektion stark ab und unterscheidet sich später kaum noch vom Zustand schein-infizierter Zellen. Induziert wird G1P2 durch Typ1-Interferone. G1P2 besitzt zwei Ubiquitin-ähnliche Domänen und besitzt Funktionen innerhalb der Proteindegradation und Zell-Zell-Signalweiterleitung. So verursacht G1P2 die Proliferation natürlicher Killerzellen sowie die Zunahme nicht MHC-Klasse I abhängiger Cytotoxizität (Meraro et al., 2002). Weitere hochregulierte

Gene sind z.B. IFIT1, IFIT2, RIG-I, MMP15 sowie CTSF. Auffällig ist, daß viele der Interferon regulierten Gene nur zu Beginn der Infektion hochreguliert sind, dann jedoch wieder stark in ihrer Transkription abflachen. Cathepsin F (CTSF) ist während aller untersuchten Zeitpunkte stärker exprimiert als in mock-infizierten Zellen. CTSF ist eine Cysteinprotease, die einen Großteil des lysosomalen proteolytischen Systems darstellt. Weiterhin wird vermutet, daß CTSF an der interzellulären Degradation, Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt ist (Santamaria et al., 1999).

Das am stärksten nach unten regulierte Gen ist Cyr61. Bis zu 7 mal schwächer als in mock-infizierten Zellen ist es 48 h p.i. transkribiert. Cyr 61 wird sekretiert und ist in die Prozesse der Zellproliferation und Zelladhäsion durch Integrine involviert (Kireeva et al., 1998). Weitere herunterregulierte Gene sind Interleukin 6, NR4A1, NFkB1A und CCND1.

4.1.6 Validierung der Microarrayexperimente durch Q-RTPCR

Um die gewonnenen Ergebnisse aus den Microarrayexperimenten zu bestätigen, wurde die quantitative Realtime PCR (Q-RTPCR) gewählt. Wie in Abschnitt 3.5.6 beschrieben, wurden einige Ergebnisse aus den Arrayexperimenten überprüft. Tabelle 4.5 zeigt eine Zusammenfassung dieser Überprüfungen.

Tabelle 4.5: Zelluläre Genexpression, analysiert mittels Q-RTPCR, verglichen mit Werten ermittelt durch Arrayexperimente.

Gen	Q-RTPCR				Faktor ^a			
	12h p.i.	24h p.i.	32h p.i.	48h p.i.	12h p.i.	24h p.i.	32h p.i.	48h p.i.
β -aktin	1	1 ^b	1	1	1	1	1	1
G1P2	44	-6.5	-1.9	-2.0	24.3	1.0	1.5	1.2
IFIT1	15	1.1	2.1	1.5	8.5	NSD ^f	NSD	NSD
CD83	1.05	-2.2	-1.5	-1.1	-1.7	-3.2	-1.2	-1.6
JunB	n.a. ^e	-2.5	-2.1	-4.4	1.4	-2.4	-2.3	-2.0
ATF2	-1.1	-0.9	-1	-1.8	1.0	-1.2	NSD	-1.2
MCC ^d	1.2	1.6	2.6	1.6	-	-	-	-
IL6	1.7	-41	-14.9	-21.9	-1.7	-3.8	NSD	-3.7
c-Myc	-1.4	-2.5	-1.6	-2.8	-1.8	-	-	-
CTSF	n.a.	1.4	2.8	3.3	1.1	1.2	2.6	2.2
ANPEP	n.a.	0.8	1.4	1.5	-1.1	1.1	1.9	1.8
CYR61	1.2	-2.0	-1.8	-2.4	NSD	-3.8	-6.1	-7.0
FUBP	n.a.	-1.0	-0.6	-0.8	1.0	1.0	-1.5	-1.3

^a Die Faktoren vergleichen Genaktivitäten in Ad12-infizierten Zellen mit mock-infizierten Zellen. Alle Faktoren wurden relativ zur Aktivität des β -Aktins^b, dessen Transkriptionsaktivität sich während der Infektion nicht änderte, normalisiert.

^c Diese Daten stammen aus Tabelle 5.4.

^d Das MCC-Gen war nicht auf dem Microarray vorhanden.

^e Nicht analysiert.

^f Kein Signal zu erkennen (englisch: No signal detectable (NSD)).

Für insgesamt 13 Gene, inklusive des β -Aktins als Referenzgen, wurden die transkriptionellen Veränderungen mit Q-RT-PCR untersucht. Auf der rechten Seite von Tabelle 4.5 sind die Werte eingetragen, die in den Arrayexperimenten ermittelt wurden. Auf der linken Seite stehen die Werte, die bei den Q-RT-PCR Experimenten errechnet wurden. Hochregulierte Gene sind in Fettschrift gedruckt, herunterregulierte Gene in Normalschrift. G1P2 ist 12 h p.i. um einen Faktor 44 hochreguliert. Danach fällt die Transkriptionsaktivität im Vergleich zu schein-infizierten Zellen stark ab (-6,5 bei 24 h p.i., -1,9 bei 32 h p.i. und -2,0 bei 48 h p.i.). Vergleicht man diese Werte mit den Array-Werten, so korreliert der 12 h-Wert. Bei anderen Werten ist die Übereinstimmung weniger deutlich. Die Tendenz des starken Abfalls stimmt jedoch in beiden Analysemethoden überein. Ähnlich verhält es sich mit dem Interleukin 6-Gen, bei dem die transkriptionelle Reduktion in der Taqmananalyse weitaus stärker erscheint als in den Arrayanalysen. Aber auch hier ist die Tendenz übereinstimmend. Für Cyr61 und CTSF entsprechen die in der PCR gemessenen Werte tendenziell ebenfalls den Werten aus den Arrayexperimenten. Es wurde auch das MCC-Gen untersucht, welches nicht auf den Glasarrays vorhanden war. Auch hier korrelieren die Werte aus den Taqmananalysen mit den Faktoren, die bereits mit Hilfe der Nylonmembranen herausgefunden worden waren. Allgemein kann man also sagen, daß die Überprüfung der Arraydaten mittels Q-RT-PCR sehr gute Übereinstimmungen ergab.

4.1.7 Analyse der Translationsaktivität regulierter Gene

Als nächstes stellt sich die Frage, ob die regulierten Gene auch wirklich translatiert werden, oder ob es möglicherweise einen Block in der Translation gibt. Dazu wurden je ein hochreguliertes (CTSf) und ein negativ reguliertes (CYR61) Gen mittels Westerntransferanalyse untersucht.

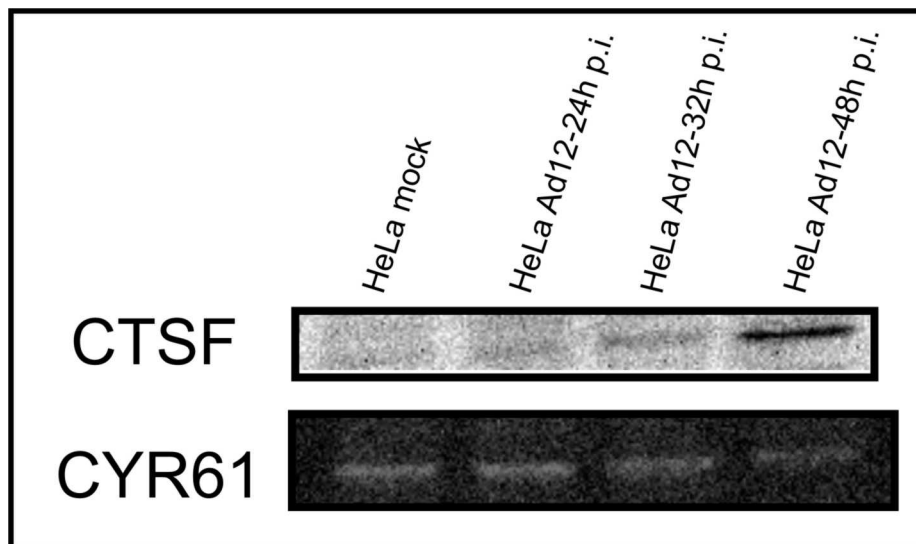


Abbildung 4.20: Westerntransferanalyse von CTSF und CYR61 zu den angegebenen Zeitpunkten während der Infektion.

Beim CTSF-Gen kann man weder 24 h p.i. noch 32 h p.i. einen signifikanten Unterschied zu mock-infizierten Zellen erkennen. 48 h p.i. jedoch steigt die Menge des CTSF-Gens um einen Faktor von ca. 5 gegenüber mock-infizierten Zellen an. Genau das umgekehrte Ergebnis erhält man für das CYR61-Gen. Bis 32 h p.i. kann man keinen nennenswerten Unterschied zu mock-behandelten Zellen feststellen. 48 h p.i. fällt das Niveau des Proteins um einen Faktor 4 gegenüber uninfizierten Zellen ab. Die Proteinmengen für beide regulierten Gene korrespondieren sehr gut mit den Ergebnissen, die in Q-RT-PCR-Analyse ermittelt wurden.

4.2 Abortive Infektion

Um die Auswirkung einer abortiven Infektion von Ad12 auf die Transkription zellulärer Gene zu untersuchen, wurden BHK21-Zellen mit 25 Pfu/Zelle Ad12-Virionen inokuliert. Die RNA wurde zusammen mit der RNA von schein-infizierten BHK21-Zellen nach 72 Stunden isoliert. Sie wurde ebenso mit DNase behandelt und mit Hilfe der Gelelektrophorese auf Degradierung sowie RT-PCR auf DNA-Verunreinigung hin untersucht. Diese Hamster-RNA wurde an die DNA auf den Arraymembranen der Firma Clontech hybridisiert, um eventuelle Unterschiede in den Expressionsmustern zu ermitteln. Diese Membranen unterscheiden sich dadurch von den Lifegridmembranen, daß zum einen weniger Gene aufgetragen sind, nämlich nur 1.176, außerdem sind diese Gene nicht doppelt aufgetragen worden. Bei den Genen handelt es sich im Gegensatz

zu den Filtern mit menschlichen Genen um Mausgene. Ein weiterer Unterschied ist die Größe. Während die Nylonmembranen 22 x 12 cm messen, haben die Membranen mit Mausgenen eine Größe von 12 x 7 cm (Abb. 4.21).

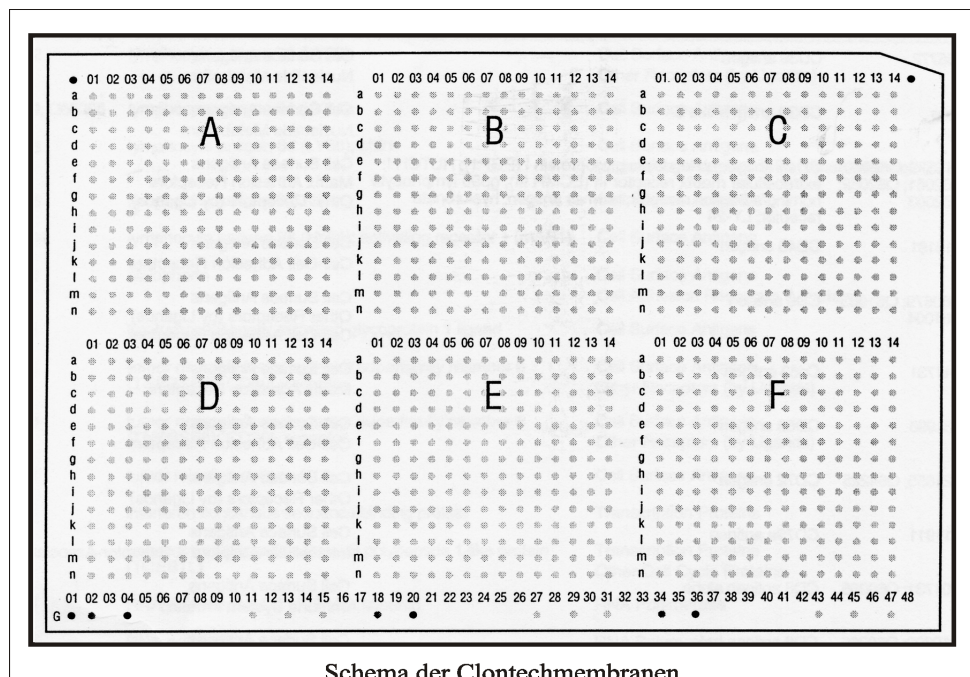


Abbildung 4.21: Schematische Darstellung eines Mausarrays der Firma Clontech.

Abb. 4.21 zeigt eine Übersicht über die Einteilung von Genen auf der Membran. Die Membran ist in sechs Felder aufgeteilt (A-F). In den beiden oberen Ecken sind zur leichteren Orientierung Positionsmarker aufgetragen. Die untere Reihe (G) trägt einige sogenannte Haushaltsgene (hellgraue Punkte), die auch als Positivkontrolle zu betrachten sind, sowie weitere Orientierungsmarker (schwarze Punkte). Auch hier lässt sich mit Hilfe des Koordinatensystems die Position jedes Gens auf der Membran feststellen. Dazu legt man eine Folie, die ein Raster der Membran zeigt, über die entwickelten Röntgenfilme.

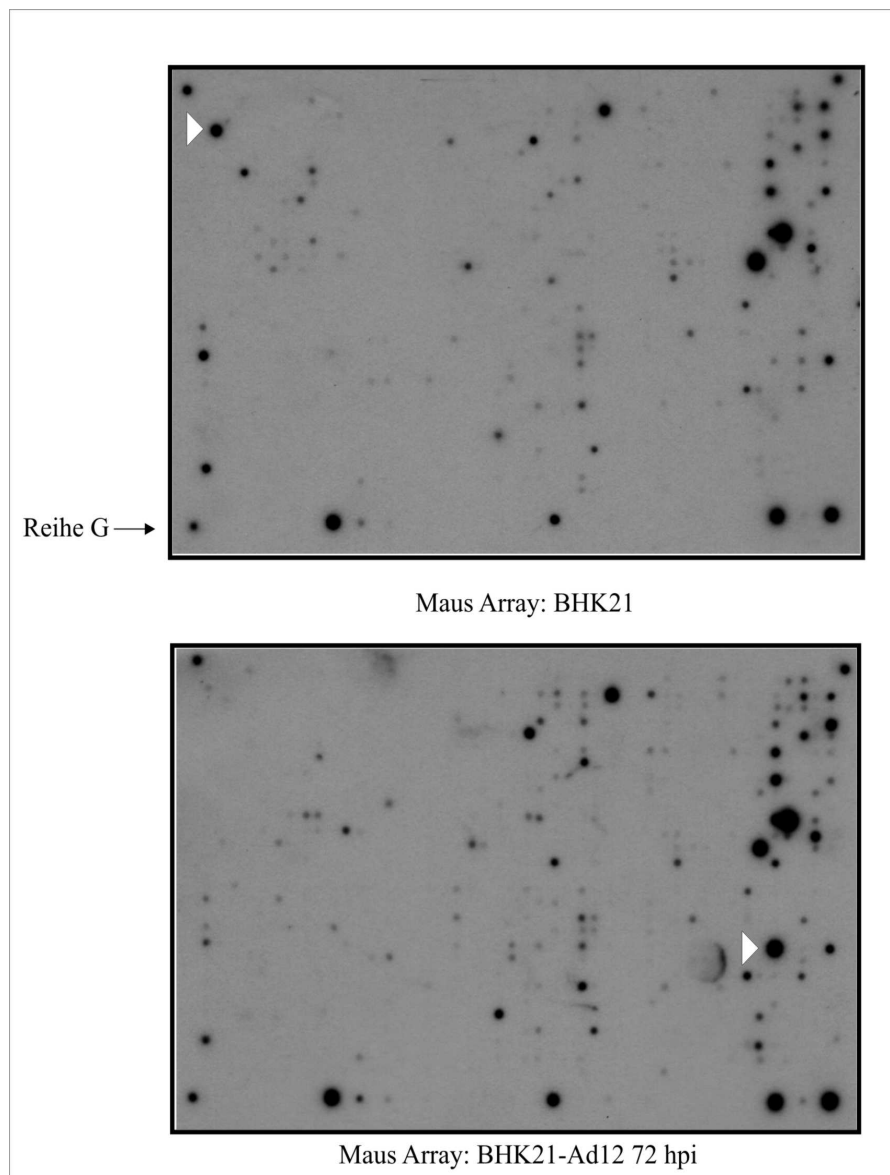


Abbildung 4.22: Maus Arrays hybridisiert mit RNA aus mock-infizierten sowie mit Ad12 infizierten BHK21-Zellen.

Die in Abb. 4.22 reproduzierten Röntgenfilme wurden nach drei Tagen Exposition entwickelt. Das Expressionsmuster sowohl von schein-infizierten Zellen ist dem von mit Ad12 infizierten BHK21-Zellen sehr ähnlich. Die infizierten BHK21-Zellen scheinen eine insgesamt stärkere Expression aufzuweisen. Nach der Infektion mit Ad12 werden die meisten Haushaltsgene unverändert exprimiert (untere Reihe G): Von rechts nach links: Ubiquitin (G11), Phospholipase A2 (G13), HPRT (Hypoxanthin-Guanin-

Phosphoribosyltransferase) an Position G15, GADPH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatase Dehydrogenase) an Position G27, Ornithindecaboxylase (G31), cytoplasmatisches β -Aktin (G43), das 45 kDa Calcium-bindende Protein (G45) sowie das 40S Ribosomale Protein S29 (G47). Zu den weiteren stark exprimierten Genen gehören die Peptidylprolylisomerase A in Position C09m sowie das Ribosomale Protein L6 in Position C11k. Diese Gene werden in Ad12 infizierten und in uninfizierten Zellen exprimiert. Die mit weißen Pfeilspitzen markierten Signal zeigen die markantesten Unterschiede beim Vergleich der beiden Expressionsmuster. Dabei handelt es sich zum einen um das Gen für das CD68 Antigen (BHK21-mock: A02d) zum andern um das Gen für das Capping Protein beta 1 (BHK21-Ad12: F10c). Das zuerst genannte Gen ist ein Zelloberflächenprotein, welches mit für die Zell-Zelladhäsion verantwortlich ist. Das Capping Protein gehört zum Cytoskellets.

4.3 Hamsterorgane und Ad12-induzierte Tumore

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Integration des Ad12-Genoms in das Wirtszellgenom Auswirkungen auf die zellulären Transkriptionsmuster hat? Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen verschiedener Hamster- und Mausorgane sowie sechs Ad12-induzierter Hamstertumoren dargestellt.

4.3.1 Hamster- und Mausorgane: Essentielle Kontrolle

Es wurde zunächst in Kontrollexperimenten geprüft, ob Maus DNA eine ausreichend große Homologie zu Hamster DNA aufweist, um die Mausarrays der Firma Clontech auch für die Analyse von Hamster DNA verwenden zu können. Dabei wurde zum einen die gesamte RNA aus Milz und Leber eines Hamsters isoliert und zum andern als Positivkontrolle die RNA der Maus aus den gleichen Organen. Die RNA wurde durch eine Reverse Transkriptase in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben und gegen die DNA auf den Mausarrays hybridisiert.

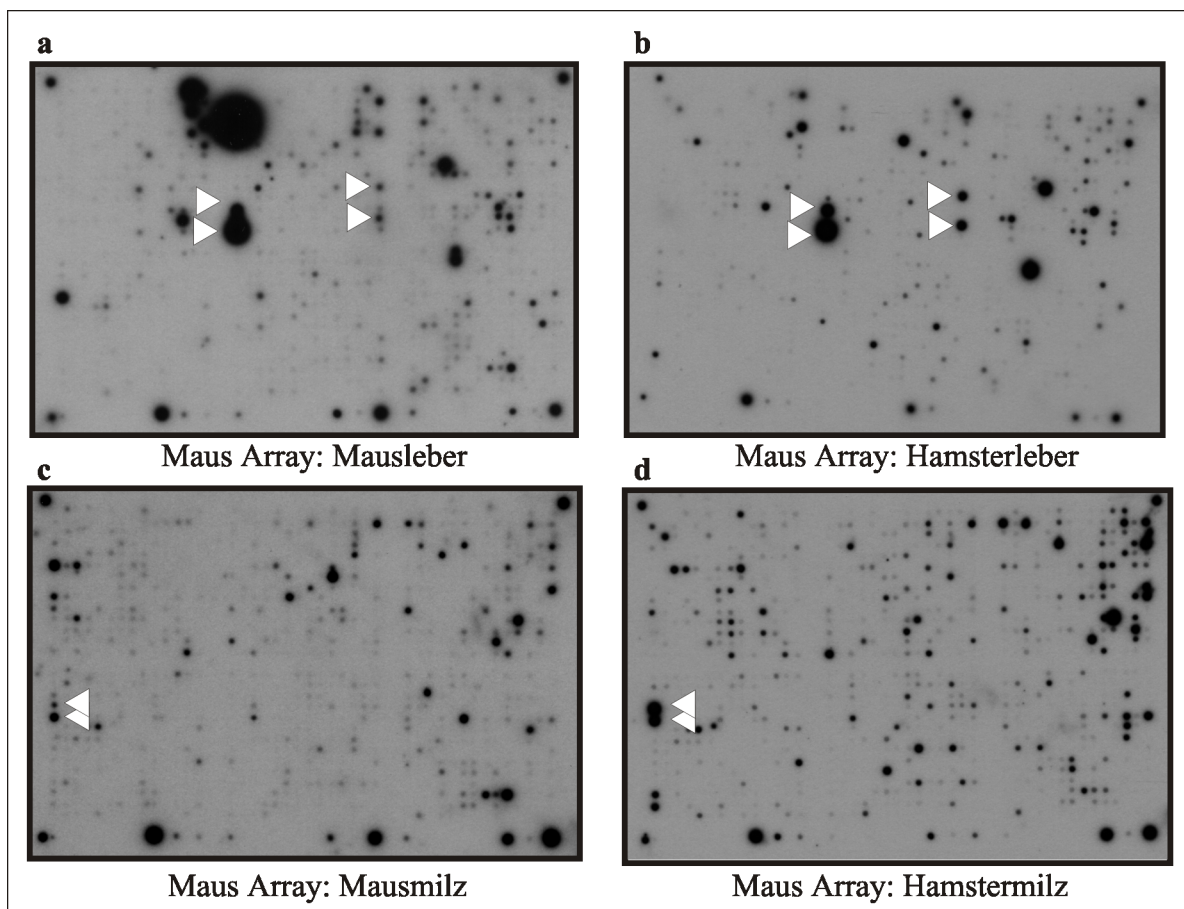


Abbildung 4.23: Maus Arrays hybridisiert mit cDNAs aus Leber und Milz von Maus und Hamster.

Die in Abb. 4.23 gezeigten Röntgenfilme wurden nach drei Tagen Exposition entwickelt. a) und c) zeigen das Expressionsmuster von Mausleber bzw. Mausmilz, b) und d) das Expressionsmuster von Hamsterleber bzw. Hamstermilz. Der Vergleich von a) mit b) ergibt neben einigen Gemeinsamkeiten doch sehr viele Unterschiede im Expressionsmuster der beiden Maus Organe. Weder bei Maus noch bei Hamster werden alle der auf der Membran aufgetragenen Gene exprimiert. Besonders fällt auf, daß das MUP1-Gen (englisch: major urinary protein) in Position B01d in der Mausleber sehr stark exprimiert ist, aber in der Hamsterleber abgeschaltet ist. Jedoch sind sowohl im Feld A als auch im Feld B einige Gene bei beiden Tieren, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, gleich exprimiert. Die Gemeinsamkeiten sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Hierbei handelt es sich um die folgenden Gene: das Retinol-Bindungsprotein (B01i) und eine Variante des Serum Albumins (B01n).

Auch bei der Milz der beiden Tiere gibt es neben einigen Gemeinsamkeiten doch erhebliche Unterschiede in den Expressionsmustern. In der Milz des Hamsters werden mehr Gene exprimiert als in der Milz der Maus. Aber auch hier gibt es einige Gene, die in beiden Organen exprimiert werden, als Beispiel sollen hier zwei Transkriptionsfaktoren, das HMG-Protein 1 (englisch: High Mobility Group) in Position D01e und das HMG-Protein 2 (D01d) erwähnt werden (Pfeilspitzen). Es gibt natürlich noch weitere Übereinstimmungen im Expressionsmuster, nur würde es den Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschreiten, alle zu erwähnen, zumal es sich hier nur um Kontrollexperimente handelt. Die Kontrollexperimente zeigten jedoch, daß es eine ausreichend große Homologie zwischen Maus und Hamster gibt, um weitere Analysen anzustellen.

4.3.2 Ad12-induzierte Hamstertumoren

Die Kontrollexperimente zeigten, daß sich die Mausarrays auch für Hamstergewebe eignen. Bei den sechs verschiedenen Hamstertumoren untersucht handelt es sich um Tumoren mit unterschiedlichen Größen aus drei verschiedenen Tieren. Die genauen Daten können der folgenden Tabelle entnommen werden (Tabelle 4.6).

	Tumor1	Tumor2	Tumor4	Tumor5	Tumor6	Tumor7
Durchmesser(cm)	1,4	0,4	0,3	0,5	1	1,2
Tier	Hamster1	Hamster1	Hamster2	Hamster2	Hamster3	Hamster3

Tabelle 4.6: Aufstellung der untersuchten Tumoren.

Die Tumoren 1 und 2 stammen vom gleichen Tier, wobei Tumor 1 wesentlich größer ist als Tumor 2. Tumor 4 und 5 stammen aus einem zweiten Hamster und sind in ihrer Größe sehr ähnlich. Tumor 6 und 7 bildeten sich in einem dritten Tier und sind mit 1 und 1,2 cm Durchmesser zu den größeren Tumoren zu zählen. Zunächst wurden die zellulären Transkriptionsmuster aller 6 Tumoren auf Clontech Nylonmembranen mit den Transkriptionsmustern der Hamsterzelllinie BHK21 sowie der Ad12-transformierten Hamsterzelllinie T637 verglichen. Abb. 4.24 zeigt die Resultate der Tumore 1, 2 und 4. Die Tumore 5-7 unterscheiden sich nicht signifikant von den hier gezeigten Tumoren.

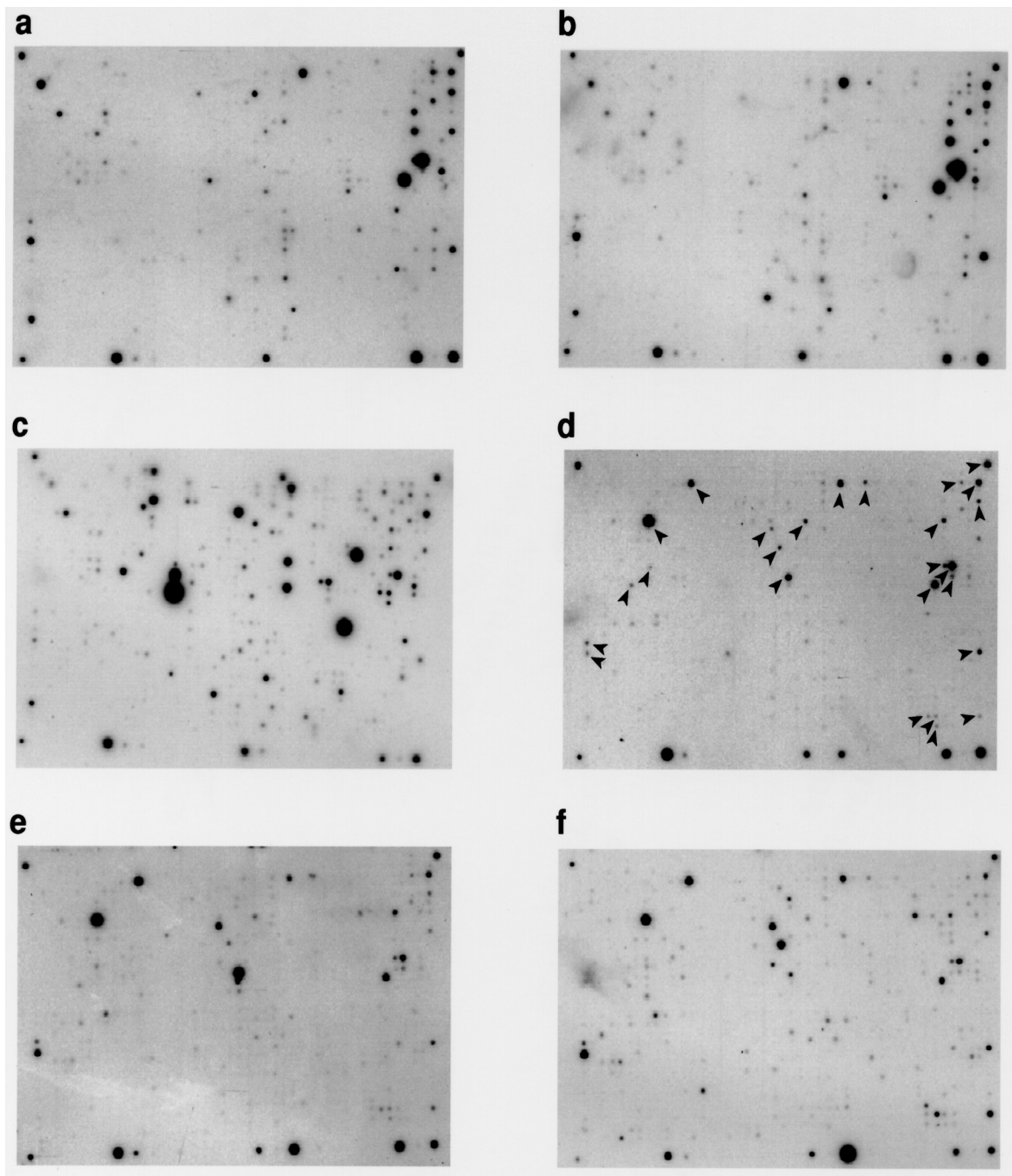


Abbildung 4.24: Darstellung der zellulären Genexpression von drei verschiedenen Ad12-induzierten Hamstertumoren (Tumor 1: d; Tumor 2: e; Tumor 4: f) im Vergleich zur Hamsterleber (c) und den Zelllinien BHK21 (a) und T637 (b). Pfeilspitzen (in d) repräsentieren Gene, die in allen drei Tumoren ähnlich stark exprimiert werden (siehe Tabelle 4.7).

In Abbildung 4.24 sind die Expressionsmuster in drei Ad12-induzierten Hamstertumoren, in der Hamsterleber sowie in den Zelllinien BHK21 und T637 dargestellt. Wenn man die Muster von BHK21 (a) und T637 (b) vergleicht, fällt eine erheblich Ähnlichkeit auf, obwohl in der Zelllinie T637 circa 15 Kopien des Ad12-Genoms stabil integriert sind. Die Leber (c) zeigt hingegen ein gänzlich anderes Expressionsmuster, als die beiden Zelllinien. Die Expressionsmuster der Tumoren ergeben eine geringere Zahl exprimierte Hamstergene exprimiert werden, als in den Zelllinien und Geweben. Nach diesen Ergebnissen exprimiert Tumor 1 (d) nur 86 der 1.176 Gene, die sich auf der Membran befinden. Bei Tumor 2 (e) sind auf dem Array 97 Signale zu erkennen, und Tumor 4 (f) exprimiert die meisten, nämlich 156 Gene. Wenn man die Größe und Herkunft der Tumoren bedenkt, ergibt sich ein interessantes Ergebnis (siehe Diskussion). Im Expressionsmuster des Tumor 1 wurden alle die Gene mit einer Pfeilspitze markiert, die in allen drei Tumoren etwa gleich exprimiert sind. Dabei wurden die sogenannten Haushaltsgene (untere Reihe) nicht in Betracht gezogen. Eine genaue Auflistung der Gene kann Tabelle 4.7 entnommen werden.

Genname	Position auf der Membran	Genklasse	Homologie zu Mausgenen	Anzahl der der exprimierten Gene (von 1176)
Ewingsarkom Homolog	A06m	Onkogen		
SRY-Box enthaltendes Gen 6	A08f	Transkriptions-aktivator & Repressor		
Timeless Homolog	A08k	Transkriptions-aktivator & Repressor		
Apolipoprotein cII	A13b	Extrazellulärer Transporter & Carrierprotein	87%	
Organischer Kationen-transporter 2	B06g	Symport & Antiport		
ATP-bindende Domäne, Transporter 1	B07i	Abc-Transporter		
Collagen I alpha-1-Untereinheit	B08l	Extrazelluläres Matrixprotein	90%	
Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor nuklearer Translokator	B10f	Allgemeines Transportprotein	87%	
GAPDH	B14b	Haushaltsgen		Tumor 1: 86 --> 7,3%
ATPase Inhibitor	C01b	Energiemetabolismus		
Peptidylprolylisomerase A	C09m	Posttranslationales Modifikations-protein		
Hitzeschock-protein 70 (HSP70)	C10f	Chaperone & Hitzeschockprotein		

Genname	Position auf der Membran	Genklasse	Homologie zu Mausgenen	Anzahl der der exprimierten Gene (von 1176)
Tumor-spezifisches 84 kDa Transplantationsantigen (HSP84)	C10k	Chaperone & Hitzeschockprotein		
Ribosomales Protein L6	C11k	Ribosomales Protein	93%	
Ribosomales Protein S5	C11l	Ribosomales Protein		
Eukaryotischer Translations-initiationsfaktor 4	C12b	Translationsfaktor		Tumor 2: 97 --> 8,2%
Heterogenes nukleares Ribonukleoprotein A1	C14b	RNA-Prozessierung		
Heterogenes nukleares Ribonukleoprotein K	C14d	RNA-Prozessierung		
HMG-Protein 2	D01d	Transkriptionsaktivator & Repressor		
HMG-Protein 1	D01e	Transkriptionsaktivator & Repressor		
Acider Keratinkomplex 1	F08l	Intermediäres Filamentprotein		
Myosin leichte Untereinheit 1	F09l	Motorprotein		Tumor 4 : 156 --> 13,2%
Nicht muskuläre leichte Kette 3 von Myosin	F09m	Motorprotein		
Spermien-spezifisches Antigen 1	F14e	Funktional nicht klassifiziert		
Tumor-Nekrose-Faktor induziertes Protein 1	F14l	Funktional nicht klassifiziert	87%	

Tabelle 4.7: Darstellung der Gene, die in allen untersuchten Hamstertumoren exprimiert werden.

Tabelle 4.7 ist in fünf Spalten unterteilt. Links sind die Namen der einzelnen Gene aufgeführt, rechts daneben folgen die Positionsbeschreibungen der Gene auf der Membran. In der Mitte sind die Klassen beschrieben, zu denen die genannten Gene funktional gehören. Die zweite Spalte von links zeigt die Homologien einiger Hamstergene zu den entsprechenden Mausgenen. Es wurden alle in der Tabelle gezeigten Hamstergene auf ihre Homologie zur Maus untersucht, jedoch waren nur die in der Tabelle dargestellten Gene in der Datenbank vorhanden sind. Die genaue Anzahl der Gene, die in den jeweiligen Tumoren insgesamt exprimiert wurden, ist in der rechten Spalte aufgeführt.

Es fällt auf, daß in allen Tumoren einige Transkriptionsfaktoren exprimiert werden. Dazu gehören zum Beispiel die HMG-Gene 1 und 2 (englisch: high mobility group) sowie das SRY-Box enthaltende Gen 6. Neben diesen Faktoren werden auch die ribosomalen Proteine L6 und S5 exprimiert, vielleicht wegen einer in den Tumoren erhöhten Translationsaktivität. Für diese Interpretation spricht die Expression des eukaryotischen

Translationsinitiationsfaktors 4 sowie der Peptidylprolylisomerase A. Desweiteren werden in den beiden kleineren Tumoren mehr Gene transkribiert als im großen Tumor. Die Haushaltsgene, die in der unteren Reihe der jeweiligen Membranen aufgetragen sind, werden in allen Tumoren, wenn auch in unterschiedlicher Stärke, exprimiert.

In weiteren Experimenten wurden 804 weitere zelluläre Gene analysiert. Dazu wurden sogenannte Maus-Cancer-Arrays der Firma Clontech verwendet. Auf diese Membranen sind 1.176 krebsspezifische Gene aufgetragen. Somit wurden insgesamt 1.980 zelluläre Gene auf ihre Expression in Ad12-induzierten Hamstertumoren untersucht.

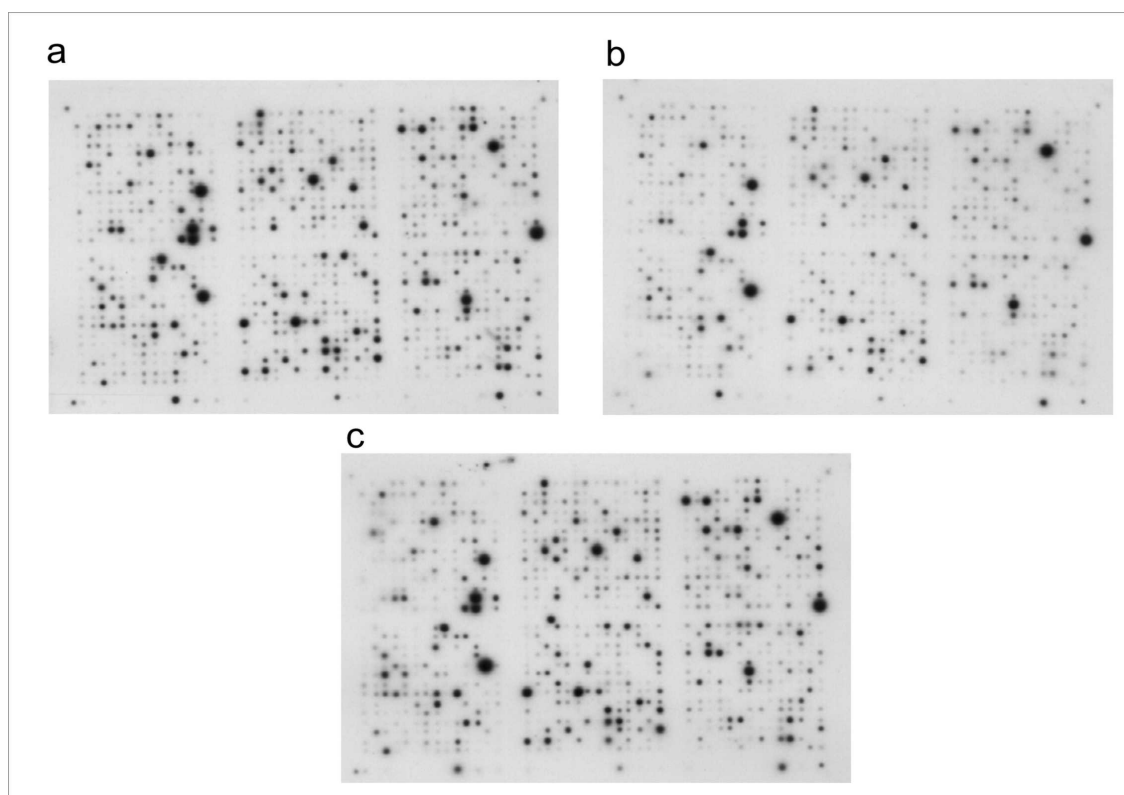


Abbildung 4.25: Darstellung der zellulären Transkriptionsmuster dreier weiterer Ad12-induzierter Tumoren auf Maus-Cancer-Arrays. a) Tumor 5 (T5), b) Tumor 6 (T6), c) Tumor 7 (T7).

Abb. 4.25 zeigt die Expressionsmuster von drei weiteren Ad12-induzierten Tumoren (T5-T7). Die Muster unterscheiden sich abgesehen von technisch bedingten Intensitätsunterschieden kaum. Manche Gene sind stärker exprimiert als andere und auch die Haushaltsgene werden in allen Tumoren weiterhin transkribiert. Die folgende Tabelle (Tabelle 4.8) gibt eine genaue Aufstellung aller exprimierten Gene auf beiden Arten von Membranen.

Tabelle 4.8: Zelluläre Gene, die in 6 verschiedenen Ad12-induzierten Tumoren transkribiert werden.^a

Genname	Genklasse	Exprimiert in Tumor Nr.
Sektion 1: Maus-Gen-Arrays		
SRY-box containing gene 6	Transcription activator and repressor	T1–T7
High mobility group protein 2	Transcription activator and repressor	T1–T7
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	RNA processing	T1–T7
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	RNA processing	T1–T7
Eukaryotic translation initiation factor 4A1	Translation factor	T1–T7
Peptidylprolyl isomerase A	Posttranslational modification protein	T1–T7
Ribosomal protein S5	Ribosomal protein	T1–T7
Ribosomal protein L6 ^b	Housekeeping gene	T1–T7
GAPDH	Housekeeping gene	T1–T7
Ornithine decarboxylase	Housekeeping gene	T1–T7
Cytoplasmic beta-actin	Housekeeping gene	T1–T7
ATPase inhibitor	Energy metabolism	T1–T7
Collagen I alpha 1 subunit (COL1A1) ^c	Extracellular matrix protein	T1–T7
Heatshock 84 kDa protein; tumor-specific transplantation 84 kDa antigen	Chaperones and heatshock proteins	T1–T7
Heatshock protein cognate 70	Chaperones and heatshock proteins	T1–T7
Ewing sarcoma homolog	Oncogene and tumor suppressor	T1–T7
Sperm specific antigen 1	Functionally unclassified	T1–T7
Tumor necrosis factor induced protein 1 ^d	Functionally unclassified	T4
Hairy and enhancer of split 3 (Drosophila)	Transcription activator and repressor	T5
Serum amyloid A3	Extracellular transport/carrier protein	T6
TEA domain family member 2	Transcription activator and repressor	T7
Arachidonate 15-lipoxygenase	Metabolism of cofactors, vitamins and related substances	T2, T4
Procollagen, type III, alpha 1	Extracellular matrix protein	T5, T6
Sepiapterin reductase	Metabolism of cofactors, vitamins and related substances	T6, T7
Transporter 1, ATP binding cassette, subfamily B (MDR/TAP)	ABC transporter	T1, T4, T6
Vascular endothelial growth factor C	Growth factors, cytokines, chemokines	T5, T6, T7
Sektion 2: Maus-Krebs-Arrays		
GATA-binding protein	Transcription factor	T5–T7
Transcription factor AP-2, gamma	Transcription factor	T5–T7
Cyclin E	Kinase activator/inhibitor	T5–T7
MAP kinase 7	Cell cycle regulating kinase	T5–T7
CDK inhibitor 1B (p27)	Oncogene	T5–T7
Integrin beta 7	Cell adhesion protein	T5–T7
Integrin alpha M (Cd 11b)	Cell–cell adhesion receptor	T5–T7
Eph receptor B2	Cell–cell adhesion receptor	T5–T7
Eph receptor B4	Cell–cell adhesion receptor	T5–T7
CD 14 antigen	Cell–cell adhesion receptor	T5–T7
Interferon gamma inducing factor binding protein ^e	Extracellular transport/carrier protein	T5–T7
Abl proto-oncogene	Oncogene	T5–T7
MAD homolog 1 (Drosophila)	Oncogene	T5–T7
Peroxisome proliferator activated receptor alpha ^f	Transcription activator and repressor	T5–T7
Gap junction membrane channel protein alpha	Cell–cell adhesion receptor	T5–T7
Procollagen, type I, alpha 1	Extracellular matrix protein	T5–T7
PKC substrate 80 K-H	Complex carbohydrate metabolism/ER	T5–T7
Chaperonin subunit 8	Chaperone/heat shock protein	T5–T7
Baculoviral IAP repeat-containing 2	Apoptosis associated protein	T5–T7
BH3 interacting (with Bcl family) domain, apoptosis agonist	Bcl2 family protein	T5–T7
Granzyme A	Protein phosphatase	T5–T7
CD28 antigen	Growth factor and chemokine receptor	T5–T7

Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite.

Genname	Genklasse	Exprimiert in Tumor Nr.
Angiogenin related protein	Growth factors, cytokines, chemokines	T5-T7
Fibroblast growth factor 7	Growth factors, cytokines, chemokines	T5-T7
GRO1 oncogene	Growth factors, cytokines, chemokines	T5-T7
Vascular endothelial growth factor B	Growth factors, cytokines, chemokines	T5-T7
Wingless-related MMTV integration site 2b	Oncogene	T5-T7
Wingless-related MMTV integration site 8b	Oncogene	T5-T7
Wingless-related MMTV integration site 5b	Oncogene	T5-T7
Adenylate cyclase activating polypeptide 1	Extracellular communication protein	T5-T7
Crystallin, zeta b	Xenobiotic metabolism	T5-T7
Integrin beta 1 binding protein 1	Cell-cell adhesion receptor	T5-T7
MAPKKK 3	Kinase activator/inhibitor	T5-T7
Proteinphosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	Intracellular protein phosphatase	T5-T7
Proteinphosphatase 3, catalytic subunit, beta isoform	Intracellular protein phosphatase	T5-T7
Proteinphosphatase 5, catalytic subunit	Intracellular protein phosphatase	T5-T7
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 8 ^h	Intracellular protein phosphatase	T5-T7
Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 5	Phospholipase and phosphoinositol kinases	T5-T7
Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, F interacting protein, binding protein 2	Other intracellular transducers/effectors/modulators	T5-T7
Alpha 1 microglobulin/bikunine	Inhibitor of proteases	T5-T7
Alpha 2 macroglobulin	Inhibitor of proteases	T5-T7
Plasminogen activator inhibitor, type I	Inhibitor of proteases	T5-T7
Procollagen, type IX, alpha 2	Cytoskeleton/motility proteins	T5-T7
Xeroderma pigmentosum, complementation group C	DNA damage signaling/repair proteins and DNA ligases	T5-T7
Excision repair 3	DNA damage signaling/repair proteins and DNA ligases	T5-T7
Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	Cell surface antigen	T5
Protein tyrosine phosphatase, receptortype, N polypeptide 2	Protein phosphatase	T5, T7
Drebrin-like	Cytoskeleton/motility protein	T5, T7

Für einige Mausgene gab es homologe Hamstergene, deren Nukleotidsequenzen folgende Identitäten aufwiesen: ^b93%, ^c90%, ^d87%, ^e85%, ^f92%, ^g91%, ^h86%. ^aZwei verschiedene Membranen der Firma Clontech, die je 1.176 Gene enthielten, wurden benutzt. Die Arrays in Sektion 2 enthalten 804 krebspezifische Gene und 372 Gene, die bereits auf den Arrays der Sektion 1 vorhanden waren. cDNAs von T1, T2, T4-T7 wurden mit den Arrays der Sektion 1 hybridisiert, die Arrays der Sektion 2 wurden nur mit den cDNAs aus T5-T7 hybridisiert.

Neben Gennamen und Genklassen sind auf der rechten Seite von Tabelle 4.8 die Bezeichnungen der Tumoren angegeben, in denen die Gene exprimiert werden. Alle untersuchten Tumore transkribieren die auf beiden Arten von Membranen aufgebrauchten Haushaltsgene. Auch einige Transkriptionsaktivatoren bzw. -inhibitoren werden exprimiert. Interessanterweise wird auch in den Ad12-induzierten Hamstertumoren das Gen für den eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor 4 transkribiert, der bereits in den Analysen zur produktiven Ad12-Infektion positive Signale ergab (siehe Tabelle 4.2). In Sektion 2 der Tabelle 4.8 sind vor allem Gene für Wachstumsfaktoren wie FGF7, das Angiogenin verwandte Protein, das GRO1 Onkogen und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor B vertreten. Zusätzlich werden, für Tumorgewebe nicht überraschend, einige Onkogene transkribiert. Dazu gehören der CDK-Inhibitor 1 (p27), das Abl Protoonkogen, welches im übrigen ebenfalls bei den Untersuchungen der produktiven Infektion positive Signale ergab (siehe Tabelle 4.3), das MAD-Homolog zu Drosophila sowie 3 Gene aus der Familie der Wingless verwandten MMTV Integrationsstelle. Insgesamt 19 Gene in Sektion 1 der Arrays werden in allen 6 untersuchten Tumoren transkribiert. Bei den Arrays, die krebspezifische Gene enthielten, liegt die Zahl mit 47

exprimierten zellulären Genen noch höher. Allerdings wurden mit diesen Membranen nur drei Tumore untersucht.

4.4 Ad12-Replikation in BHK21-Zellen?

Schon seit vielen Jahren beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe mit der abortiven Infektion der Hamsterzelllinie BHK21 mit Adenovirus Typ 12. In seiner Dissertation beschäftigte sich Dennis Webb mit der frühen Phase der abortiven Infektion (Dissertation, Dr. Dennis Webb, Universität zu Köln, 2004). Eine Hypothese seiner Arbeit war, daß die fehlende Replikation von Ad12 DNA und von Ad12 Virionen in BHK21-Hamsterzellen (Hösel et al., 2001) mit der geringen Aufnahme von Ad12 DNA in den Hamsterzellkern zu tun hat. Ein Grund dafür könnte die fehlende Expression des CAR-Rezeptors oder die Expression eines falschen CAR-Rezeptors in BHK21-Zellen sein. Daher transfizierte er den menschlichen CAR-Rezeptor in die Hamsterzellen und konnte feststellen, daß dadurch Virus-DNA sehr effizient in den Zellkern der Zellen gelangt (Dissertation Dr. Dennis Webb, Universität zu Köln, 2004). Als Fortsetzung dieser Arbeit interessierte uns, ob aus dieser Mehraufnahme von Ad12-DNA eine produktive Infektion resultiert. Dazu sollte hCAR in BHK21-Zellen transfiziert werden. Zunächst mussten jedoch die geeigneten Bedingungen für die Transfektion von hCAR in BHK21-Zellen bestimmt werden. Dazu wurde ein GFP-exprimierendes Plasmid (peGFP-c1), welches auch die Basis für das hCAR-Konstrukt bildet, unter verschiedenen Transfektionsbedingungen mit Hilfe des Nucleofectors II der Firma amaxa GmbH, Köln in BHK21-Zellen eingebracht. Mittels FACS-Analyse wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Die folgende Abbildung (Abb. 4.26) zeigt das Ergebnis der FACS-Analyse.

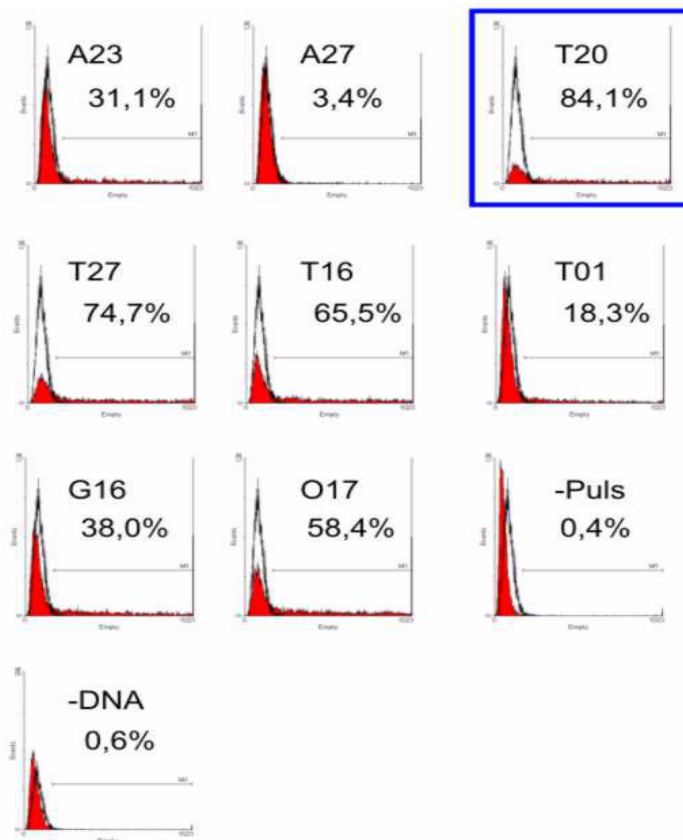


Abbildung 4.26: FACS-Histogramme zur Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen von BHK21-Zellen mit peGFP-c1.

Abb. 4.26 zeigt die FACS-Histogramme der Testtransfektion von BHK21-Zellen mit peGFP-c1. Die schwarz unterlegten Kurven zeigen untransfizierte BHK21-Zellen. Die roten Bereiche unter den zweiten Kurven jedes Histogramms geben ein Maß für die Anzahl der erfolgreich transfizierten BHK21-Zellen. Als Negativkontrollen wurden die Zellen einmal ohne DNA mit einem Transfektionsimpuls behandelt und umgekehrt einmal nur mit der zu transfizierenden DNA ohne Impuls versetzt (Histogramme „-DNA“ und „-Puls“). Die Prozentwerte geben die jeweilige Transfektionseffizienz an. Damit eignen sich die Programme T20 und T27 am besten, BHK21-Zellen zu transfizieren. Die Effizienzen liegen bei 84,1% bzw. 74,7%. Für die weiteren Experimente wurde das Programm T20 verwendet.

Wir transfizierten BHK21-Zellen mit dem menschlichen CAR-Rezeptor in der beschriebenen Weise und infizierten diese 8 h nach Transfektion mit 30 bzw. 100 Pfu Ad12/Zelle. Parallel wurden als Positivkontrolle HeLa-Zellen mit 25 Pfu Ad12/Zelle infiziert. Durch metabolisches Markieren mit ^{33}P -Orthophosphat sollte die neu

synthetisierte Ad12 DNA und die Bildung von neuen Ad12 Virionen nachgewiesen werden. 72 h p.i. wurden beide Zellarten geerntet, und die neugebildeten Ad12 Virionen wurden mittels Gleichgewichtssedimentation im CsCl-Gradienten isoliert. Nach der Virusisolation, wurde der CsCl-Gradient in Fraktion á 3 Tropfen aufgeteilt und in einem Szintillationsgerät vermessen.

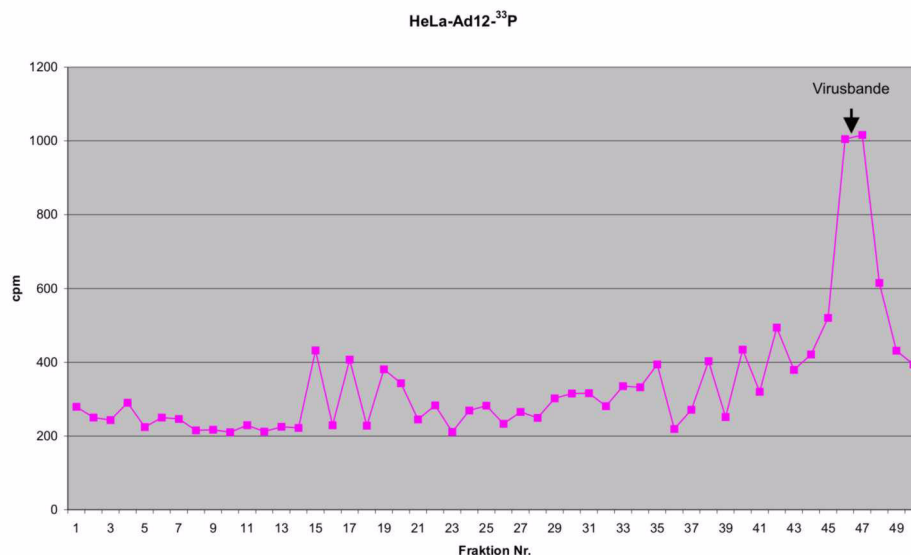


Abbildung 4.27: Darstellung der radioaktiven Zerfälle pro Minute (Y-Achse) gegen die gesammelten Fraktionen (X-Achse) für HeLa-Zellen infiziert mit 25 Pfu Ad12/Zelle.

Abb. 4.27 zeigt das Ergebnis der Messung radioaktiver Zerfälle pro Minute bei HeLa-Zellen, die mit 25 Pfu Ad12/Zelle infiziert wurden. Man erkennt deutlich den Anstieg der Kurve zwischen den Fraktionen 45 -48. Hier steigen die Werte von ca. 250 cpm (englisch: counts per minute) auf über 1000 cpm an. Das Maximum der Kurve korreliert mit der im Gradienten sichtbaren Virusbande, die sich ebenfalls in den Fraktionen 45-48 befand. Daraus kann man schließen, daß die metabolische Markierung der neusynthetisierten Virus-DNA funktioniert hat.

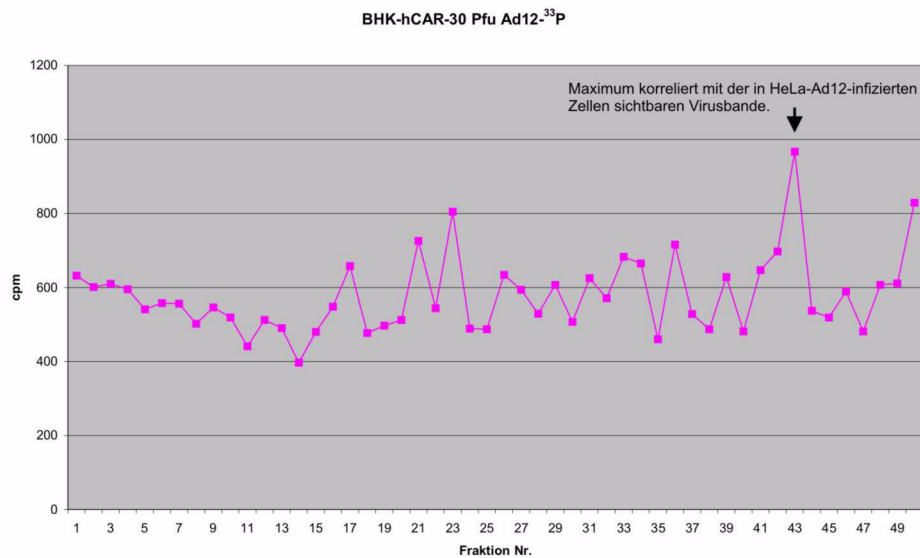


Abbildung 4.28: Darstellung der radioaktiven Zerfälle pro Minute (Y-Achse) gegen die gesammelten Fraktionen (X-Achse) für BHK21-Zellen infiziert mit 30 Pfu Ad12/Zelle.

Abb. 4.28 zeigt das gleiche Experiment nur für BHK21-Zellen, die mit hCAR transfiziert und mit Ad12 infiziert wurden. Auch in diesem Experiment ist ein Anstieg der Kurve zu erkennen. Er liegt zwischen den Fraktionen 41 - 44. Die Hintergrundstrahlung liegt in diesem Experiment zwar bei ca. 600 cpm, dennoch ist der eindeutige Anstieg auf fast 1.000 cpm deutlich zu sehen. Auch in diesem Experiment korrelieren das Maximum der Kurve mit der in HeLa-Ad12-infizierten Zellen sichtbaren Virusbande (Abb. 4.27). Ob man aber dieses Ergebnis als Durchbruch der Blockierung der Ad12-Replikation in BHK21-Zellen sehen kann, wird noch diskutiert werden.

5 Diskussion

5.1 Produktive Infektion

Adenovirus Typ 12 (Ad12) repliziert sich in menschlichen Zellen produktiv. Hier sollte untersucht werden, wie sich diese produktive Replikation auf die Transkription des Wirtszellgenoms auswirkt? Um in eine solche Analyse möglichst viele zelluläre Gene einzuschließen, wurden cDNA-Microarrayexperimente sowohl mit Nylonmembranen als auch auf Glassobjektträgern durchgeführt. Die auf Nylonmembranen untersuchten mit Ad12 infizierten HeLa-Zellen zeigen im Hinblick auf die Expression der zellulären Gene ein Bild, welches man auf den ersten Blick erwarten würde. Mit fortschreitendem Verlauf der Infektion nimmt die Zahl der transkribierten Gene rapide ab (siehe Abb. 5.5 - Abb. 5.8). Aus diesem Grund wurde auch die cytoplasmatische RNA der Zellen isoliert. Es sollten nur die mRNAs untersucht werden, die sich zum jeweiligen Zeitpunkt der Infektion auch im Cytoplasma der Zelle befanden. Allerdings wäre ein Vergleich zwischen cytoplasmatischer und kompletter RNA im Rahmen dieser Untersuchungen interessant, um zu sehen, ob bestimmte zelluläre Gene zwar noch transkribiert werden, aber nicht mehr aus dem Zellkern gelangen. Ad12 blockiert den Transport zellulärer mRNAs durch die Gene E1B-55kDa und E4-orf6. Zu den herunter regulierten Genen gehören auch das MHC Klasse I-Gen und c-Myc. Somit konnten die von anderen Arbeitsgruppen (Timmers et al., 1988, Proffit et al., 1994, Huvent et al., 1997) publizierte Daten auch für die Infektion mit dem hochonkogenen Adenovirus Typ 12 bestätigt werden. Ein möglicher Grund für diese Abnahme der Transkription liegt beim MHC Klasse I-Gen wahrscheinlich in der Möglichkeit für das Virus, den Abwehrzellen des Wirtes zu entgehen (siehe Abb. 4.11). c-Myc ist ein Gen, das mit für die Proliferation der Zellen verantwortlich ist. Möglicherweise kann das Virus durch die Hemmung dieses Gens verhindern, daß sich die infizierte Zelle weiter teilt (siehe Abb. 4.10). Dadurch kann das Virus seinen Infektionszyklus erfolgreich abschließen. Allerdings ist Ad12 auch auf bestimmte Wirtszellgene angewiesen, ohne die es sich nicht replizieren kann. So ist es nicht verwunderlich, daß die Expression einiger Gene im Verlauf der Infektion an Stärke zunimmt. Manche dieser Gene benutzt das Virus für seine eigenen Zwecke, wie zum Beispiel den eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor 4, andere werden von der Wirtszelle als Reaktion auf die Infektion stärker exprimiert. Im Ergebnisteil (siehe Abschnitt 4.1.3) wurden nur die Gene erwähnt, die um mindestens einen Faktor 5 stärkere Signale auf der Membran abgaben. Wenn man sich allerdings die kompletten Listen betrachtet, so belaufen sich die Gesamtzahlen der hoch regulierten Gene auf weit

über 500. Nach 48 Stunden jedoch ist die Überexpression der zellulären Gene nicht mehr so stark wie nach 32 Stunden. Das könnte daran liegen, daß ein Großteil der Transkription und der Translation der Proteine, die das Virus zur Herstellung neuer infektiöser Viruspartikel benötigt, zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen ist.

Im zweiten Teil der Arrayanalyse wurden insgesamt vier unterschiedliche Zeitpunkte während der produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12 mit schein-infizierten Zellen verglichen. Dabei liegt die Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene mit 72 deutlich unter der Zahl, die mittels der Nylonmembranen ermittelt wurden. Das liegt an der Art der Auswertung, die bei den Glasarrays angewendet wurde. Es wurden nur Gene mit einbezogen, die auf 22 der 24 Arrays ein Signal zeigten. Damit werden alle Gene ausgeschlossen, die z.B. 12 h p.i. noch exprimiert werden, zu späteren Zeitpunkten jedoch nicht mehr. Einerseits liegt in dieser Art der Analyse ein Nachteil, weil man so sehr viele zelluläre Gene von Beginn an ausschließt. Auf der anderen Seite ist darin auch ein Vorteil zu sehen, da man sich nur auf die Gene konzentriert, die während der gesamten Infektion transkribiert werden. 13 der 72 regulierten Gene wurden mittels Q-RT-PCR in ihrer differentiellen Expression bestätigt (Tabelle 4.5), und für zwei unterschiedlich transkribierte Gene wurden anhand von Westerntransferanalysen auch auf Proteinebene die Unterschiede aufgezeigt (Abb. 4.20).

Die DNA-Replikation von Ad12 beginnt in produktive infizierten HeLa-Zellen zwischen 12 und 14 h p.i. (Scheidtmann et al., 1975). 12 h p.i. sind die Gene der zellulären Abwehr, wie G1P2, IFIT1 und IFIT2, stark hochreguliert (siehe Tabelle 4.4 und Tabelle 4.5). Als Antwort auf diese antiviralen Mechanismen der infizierten Zelle, sind die viralen Gene der E3-Region bereits 14 h p.i. sehr stark exprimiert (Dissertation Dr. Dennis Webb, Universität zu Köln, 2004; Webb et al. in preparation). Dieses hohe Transkriptionsniveau der viralen E3-Gene bleibt über den gesamten Infektionszyklus erhalten. Andere zelluläre Gene, deren Transkriptionsaktivitäten nach 12 h erhöht sind, gehören zu den Helikase-, Cytoskelett- und Peptidaseengruppen. Dagegen sind viele Gene der Signaltransduktion, chromosomalen Organization, Zellzykluskontrolle oder Apoptose 12 h p.i. herunterreguliert. Zu späteren Zeitpunkten ist diese Reduktion der Transkription noch stärker. Für die Apoptosegene z.B. ist die Hemmung der Transkription für Ad12 sinnvoll, da ein zu früher Zelltod im Gegensatz zu den viralen Interessen einer vollständigen Replikation steht. Ein weiteres hochreguliertes Gen ist Cathepsin F (CTSF). Es wird während des gesamten Infektionszyklus stärker transkribiert als in schein-infizierten Zellen. CTSF ist an der Proteindegradation beteiligt. Sollte sich diese Degradation gegen zelluläre Proteine richten, könnten neu synthetisierte Viruspartikel die Wirtszelle möglicherweise leichter verlassen. Auch bei der produktiven Infektion

menschlicher Zellen mit Ad2 werden zwei lysosomale Proteasen induziert, CTSD und CTNS (Zhao et al., 2003). Eines der am stärksten herunterregulierten zellulären Gene ist CYR61, das bis zu 7 mal schwächer transkribiert wird, als in schein-infizierten Zellen. Welchen Zweck könnte Ad12 mit der Herunterregulierung dieses Gens verfolgen? CYR61, auch bekannt als CCN1, gehört zur Familie der CCN-Proteine (CYR61/CTGF/NOV) und kodiert für ein 379 Aminosäuren langes Polypeptid, welches mit der extrazellulären Matrix und der Zellmembran assoziiert ist. Eine Funktion dieses Proteins besteht darin, mit einer Vielzahl von Integrinen zu interagieren, um die Zelladhäsion aufrecht zu erhalten. Gezeigt wurde diese Funktion durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen CYR61, die die Zelladhäsion effektiv inhibieren (Lau et al., 1999; Planque und Perbal, 2003). Wie in Tabelle 4.4 zu erkennen ist, sind noch weitere Gene, die für die Zelladhäsion verantwortlich sind, in ihrer Transkription negativ beeinflusst. Durch die Herunterregulierung dieser Gene könnte Ad12 eine verminderte Zelladhäsion und daraus resultierend einen lockereren Gewebezusammenhalt hervorrufen. Als Konsequenz daraus könnte sich der Adenovirus-spezifische cytopathische Effekt über die infizierte Einzelzellschicht oder das infizierte Gewebe effizienter entwickeln. Schließlich könnte das Virus so über einen größeren Raum hin verteilt werden, um andere Zellen zu infizieren. Ein anderes Mitglied der CCN-Familie, CTGF (englisch: Connective tissue growth factor), ist in Ad2 E1A-positiven menschlichen Bronchialepithelzellen hochreguliert (Ogawa et al., 2004). Ob diese Tatsache etwas mit der unterschiedlichen Onkogenität zwischen Ad2 und Ad12 zu tun haben könnte, ist nicht bekannt.

Im folgenden werden einige allgemeine Probleme der Arraytechnik diskutiert. Bei der Auswertung der Filter ist man stark an Computeranalysen gebunden. Zum einem hat man keinen Einfluß auf die Auswertung der einzelnen Intensitäten, das heißt man ist abhängig davon, wie exakt diese Messungen durchgeführt werden. Zum andern kann man bestimmte Unterschiede, die der Computer erfaßt, auf der Membran nicht mit dem Auge nachvollziehen. Hier spielt die Normalisierung eine wichtige Rolle. Will man zwei Punkte auf verschiedenen Filtern miteinander vergleichen, geschieht dies folgendermaßen. Es werden die Intensität des Signals auf dem einen Filter (B) mit einer Konstante multipliziert. Diese Konstante ergibt sich aus der Division der Gesamtintensität aller Signale auf Filter A mit der Gesamtintensität aller Signale auf Filter B. Somit entstehen je nachdem welche Filter man vergleicht, immer neue Werte für das Signal auf Filter B. Dadurch werden viele Signale durch den Computer aufgewertet, obwohl sie rein optisch schwächer sind. Darin liegt die Schwäche der für die Membranen angewandten globalen Normalisierung. Aus diesem Grund wurden hier auch nur eindeutige Unterschiede in der Expression erwähnt.

Auch wenn die Quantifizierung der Glasarrays durch die visuelle Kontrolle aller Signale arbeitsaufwendig ist, hat man den eindeutigen Vorteil, daß man jeden Schritt der Auswertung selber kontrollieren kann. Auch bei der Analyse dieser Art von Arrays ist man sehr stark auf den Computer angewiesen. Das Problem der „verlorenen Gene“ durch die Art der Auswertung mit SAM (englisch: Significance analysis of microarrays) Methode wurde weiter oben bereits beschrieben. Es wäre interessant, auch diese Gene auszuwerten, jedoch ist das mit dieser Software leider nicht möglich, da sie auf eine bestimmte Anzahl von Werten angewiesen ist.

5.2 Abortive Infektion

Ad12 infiziert Hamsterzellen abortiv. Diese Art der Infektion wird als einer der Hauptgründe für das hohe onkogene Potential von Ad12 gesehen. Deswegen interessierte uns die Auswirkungen einer Ad12-Infektion in BHK21-Zellen auf die Transkription der zellulären Gene. Allerdings gibt es bis heute keine Arrays, die auf Hamstergenomen basieren. Darum wurden als Alternative Mausarrays verwendet. Die Sequenzhomologien zwischen Maus und Hamster scheinen ausreichend zu sein, um Hamster-RNA auf Mausarrays zu untersuchen. Die gezeigten Übereinstimmungen von bis zu 96 % in der DNA-Sequenz (siehe Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8) waren ausreichend, um Tests durchzuführen. Die erhaltenen Muster konnten mehrmals reproduziert werden (Daten nicht gezeigt), sodaß die Membranen für die weiteren Experimente benutzt werden konnten. Ein weiteres Problem könnte die Verwendung des CDS-Primermixes sein. Dieser Primermix ist speziell für Maus-RNA ausgelegt. Dadurch könnten einige mRNAs des Hamsters, und damit auch Signale auf der Membran, während der reversen Transkription verloren gegangen sein. Ein Vorteil der Mausarrays liegt in ihrer Überschaubarkeit. Dadurch daß „nur“ 1.176 Gene auf die Membran aufgebracht sind, ist die Orientierung auf der Membran und die Auswertung wesentlich unkomplizierter.

Die untersuchten BHK21-Zellen zeigen in ihren Expressionsmustern nach der Ad12-Infektion nur geringe Unterschiede. Daraus kann man schließen, daß die Infektion von BHK21-Zellen mit Ad12 nur eine schwache Auswirkung auf die Genexpression der Zellen hat. Da sich das Ad12 Virus auf BHK21-Zellen nicht replizieren kann, kann es seinen Einfluß auf die zelluläre Transkription, welches es offensichtlich besitzt (siehe Abb. 4.5 - Abb. 4.8), nicht nutzen. Es lassen sich lediglich zwei markante Unterschiede zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen feststellen (siehe Abbildung 4.22). Zum einen handelt es sich um das CD68-Antigen, ein Zelloberflächenprotein, das mit für die Zell-Zelladhäsion verantwortlich ist. Beim Menschen findet man dieses Antigen häufig

auf der Oberfläche von malignen Melanomen (Facchetti et al., 1991). Dieses Gen wird nach einer Infektion von BHK21-Zellen mit Ad12 allerdings herunterreguliert. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der produktiven Infektion von HeLa-Zellen mit Ad12 (siehe Tabelle 4.4). Auch hier sind Gene, die die Funktion der Zell-Zelladhäsion übernehmen, herunterreguliert.

5.3 Maus- und Hamsterorgane

Um zu sehen, ob sich verschiedene Organe von Maus und Hamster in ihren Expressionsmustern unterscheiden, wurden Leber und Milz der Tiere untersucht. Man würde erwarten, daß die Muster der gleichen Organe bei verschiedenen Tieren zu einem großen Teil übereinstimmen. Doch das Gegenteil ist der Fall. Es ist festzustellen, daß sich die Muster von beiden Organen zwischen Hamster und Maus erheblich unterscheiden (siehe Abbildung 4.23). Der Grund dafür ist offensichtlich. Es handelt sich zwar um die gleichen Organe, die miteinander verglichen werden, jedoch aus zwei völlig unterschiedlichen Tierarten. Die Sequenzhomologien sind überzeugend, was jedoch nicht heißt, daß die Organ-spezifischen Transkriptionsmuster bei beiden Tieren auf dieselbe Weise reguliert werden. Aber es gibt auch einige Übereinstimmungen, die belegen, daß die Verwendung von Maus DNA Membranen für die Analyse der Transkription von Hamstergenomen durchaus verlässliche Daten liefern kann.

5.4 Ad12-induzierte Hamstertumoren

Bevor die Expressionsmuster der drei von Ad12 induzierten Hamstertumoren diskutiert werden, sollte zunächst die Ad12-transformierte Zelllinie T637 betrachtet werden (siehe Abbildung 4.24 b). In dieser Zelllinie sind circa 15 Kopien des Ad12-Genoms chromosomal stabil integriert. Wenn man jedoch das Expressionsmuster dieser Zelllinie mit dem von BHK21-Zellen (siehe Abbildung 4.24 a) vergleicht, fällt auf, daß sich diese beiden Muster sehr ähnlich sind. Man würde vermuten, daß die 15 Kopien des Ad12-Genoms einen erheblichen Einfluß auf die zelluläre Genexpression haben, da in der Zelllinie T637 einige Gene von Ad12 exprimiert werden. Dies wurde mit Hilfe von selbst hergestellten Ad12-Arrays herausgefunden (Dissertation Dr. Dennis Webb, Universität zu Köln, 2004). Zu den transkribierten Regionen gehören die E1A-Region, die E1B-

Region sowie die E3- und die E4-Region.

Wenn man sich die Transkriptionsmuster der sechs Tumoren ansieht, fällt auf, daß hier sehr viel weniger Gene exprimiert werden, als in allen anderen Vergleichszellen bzw. Geweben. Zunächst werden die Expressionsmuster betrachtet, die drei der sechs Tumoren auf normalen Mausarrays gebildet haben. Maximal 13,2 % (Tumor 4) der sich auf der Membran befindlichen Gene werden transkribiert. Man kann diese Tumoren nicht direkt mit einem bestimmten Organ des Hamsters vergleichen, da man die Ursprungszellart für die Tumorentstehung nicht kennt. Morphologisch gesehen, bilden die Tumoren Homer-Wright Rosettenstrukturen von primitiven neuroektodermalen Tumoren (Hohlweg et al., 2003). Darum kann man bis jetzt auch kein geeignetes Gewebe zum direkten Vergleich heranziehen. Da in den Tumoren ebenfalls, wenn auch in unterschiedlicher Multiplizität, Ad12-Genome integriert sind, kann man sie am ehesten mit der Zelllinie T637 vergleichen. Aber auch hier sind massive Unterschiede festzustellen.

Daher besteht bis zu diesem Zeitpunkt nur die Möglichkeit, die Tumore untereinander zu vergleichen. Hier fällt auf, daß in den kleineren Tumoren (T2, 4 und 5) mehr zelluläre Gene als im großen Tumor (T1) exprimiert werden. Das könnte daran liegen, daß die kleinen Tumore, bedingt durch ihre Größe, einen Rest des normalen Zellstoffwechsels aufrecht erhalten können, was dann zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr möglich ist. Ein anderer Grund für die Transkriptionsunterschiede könnte darauf beruhen, daß unterschiedliche Regionen einzelner Tumoren für die RNA-Analyse verwendet worden sein könnten. Im Innern eines Tumors könnten ganz andere Bedingungen herrschen als am Randbereich, aus dem die RNA isoliert wurde. Speziell könnte dies für die großen Tumore gelten. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, daß die RNA nicht direkt nach der Entnahme der Tumore aus dem Tier isoliert wurde, sondern erst nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff. Möglicherweise hat diese Behandlung auch Auswirkungen auf die Nachweisbarkeit der zellulären Genexpression. Aber es gibt auch große Übereinstimmungen innerhalb der sechs Tumoren (siehe Tabelle 4.8). 17 Gene werden in allen Tumoren exprimiert, was bei Tumor 1 fast 25 % aller nachweisbar exprimierten Gene ausmacht. Darunter befinden sich einige Transkriptionsfaktoren sowie ribosomale Proteine. Das läßt auf eine erhöhte Proteinsyntheseaktivität und damit wahrscheinlich auf eine erhöhte Zellteilungsrate schließen. Dabei scheint es keinen Unterschied zu machen, ob die Tumore aus dem gleichen Tier oder aus unterschiedlichen Tieren stammen.

5.5 Replikation von Ad12 in BHK21-Zellen?

Seit vielen Jahren beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe mit der abortiven Infektion von BHK21-Zellen mit Ad12. Bereits 2001 konnte nach Transfektion des präterminalen Proteins (pTP) und des E1A-Gens in BHK21-Zellen Ad12 DNA-Replikation nachgewiesen werden (Hösel et al., 2001). Allerdings wurden keine infektiösen Viruspartikel hergestellt. Ein Grund für die abortive Infektion von Ad12 in Hamsterzellen liegt wahrscheinlich darin, daß zu wenig Ad12-DNA in den Zellkern der infizierten Hamsterzellen gelangt. Ad12 benutzt den menschlichen Coxsackie und Adenovirusrezeptor (hCAR) zur Penetration der zu infizierenden Zellen. BHK21-Zellen exprimieren sehr wahrscheinlich keinen oder den falschen CAR-Rezeptor. In seiner Dissertation konnte Dennis Webb zeigen, daß durch Transfektion von hCAR mehr Ad12-DNA in den Zellkern von BHK21-Zellen gelangt, und zwar auf einem Niveau, das mit produktiv infizierten HeLa-Zellen vergleichbar ist (Dissertation Dr. Dennis Webb, Universität zu Köln, 2004). In einem weiteren Versuch, den Replikationsblock von Ad12 in Hamsterzellen zu überwinden, wurde hier hCAR in BHK21-Zellen transfiziert und die Zellen anschließend mit Ad12 infiziert. Durch radioaktives metabolisches Markieren sollte nach der Isolation von Viruspartikeln in einer Gleichgewichtssedimentation im CsCl-Gradienten neu synthetisierte Virus-DNA nachgewiesen werden. In Abbildung 4.28 kann man auch einen Anstieg der Radioaktivität in den Fraktionen feststellen, die in etwa der sichtbaren Virusbande von infizierten HeLa-Zellen entspricht. Im Gradienten der BHK21-transfizierten und infizierten Zellen war jedoch keine Virusbande sichtbar. Allerdings zeigten anschließend durchgeführte Plaqueassays mit A549-Zellen unschlüssige Resultate (Daten nicht gezeigt). Auch eine radioaktive Markierung neu synthetisierter Proteine führte zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis. Anscheinend wird neue Ad12-DNA synthetisiert, aber es ist zur Zeit noch nicht zu beurteilen, ob nach Transfektion von hCAR infektiöse Viruspartikel in den Ad12-infizierten BHK21-Zellen gebildet werden.

6 Zusammenfassung

Die Infektion menschlicher Zellen mit Adenovirus Typ 12 (Ad12) verläuft produktiv, während sie in Hamsterzellen abortiv verläuft. Die produktive Infektion hat massive Auswirkungen auf die infizierte Wirtszelle. Bestimmte zelluläre Gene werden durch das Virus für die eigene Replikation umprogrammiert. In der vorliegenden Arbeit benutzten ich die DNA Microarraytechnik, um die Transkriptionsprofile zellulärer Gene nach einer Infektion mit Ad12 zu bestimmen. Zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit Ad12 (12, 24, 32 und 48 h p.i.) wurde die Transkription zellulärer Gene mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Arraymethoden mit schein-infizierten HeLa-Zellen verglichen. Die Untersuchungen auf Nylonmembranen ergaben erste Hinweise auf das Hochregulieren bestimmter zellulärer Gene. Obwohl circa 90% der zellulären Gene 48 h p.i. herunterreguliert werden bzw. abgeschaltet sind, gibt es über 500 Gene, die im Vergleich zu schein-infizierten Zellen stärker exprimiert werden. Die anschließende genauere Analyse auf Glasarrays ergab die differentielle Expression von insgesamt 72 zellulären Genen. Zu den am stärksten regulierten Genen gehören G1P2, IFIT1, IFIT2, CTSF und CYR61. G1P2, IFIT1 und IFIT2 gehören zur Gruppe der Interferon regulierten Gene und sind nur zu Beginn der Infektion hochreguliert und fallen zu späteren Zeitpunkten in ihrer Transkription ab. CTSF ist in der Proteindegradation involviert und wird während des gesamten Infektionszyklus stärker transkribiert als in schein-infizierten Zellen. Falls diese Proteindegradation gegen zelluläre Proteine gerichtet sein sollte, könnten neu synthetisierte Viruspartikel die Wirtszelle möglicherweise leichter verlassen. Das am stärksten nach unten regulierte zelluläre Gen ist CYR61. Das Protein ist in der Zelladhäsion involviert und interagiert mit multiplen Integrinen. Durch die starke Abschwächung der Transkription kann sich der cytopathische Effekt nach der Infektion möglicherweise besser entwickeln und somit zu einer besseren Verbreitung der neu synthetisierten Viruspartikel führen. Die Microarraydaten wurden für 13 zelluläre Gene, die signifikante Änderungen nach der Ad12-Infektion zeigten, durch quantitative real-time PCR validiert. Für die beschriebenen Gene CTSF und CYR61 wurden die transkriptionellen Veränderungen auch auf der Proteinebene durch Westerntransferanalysen bestätigt.

Zusätzlich wurden die Transkriptionsprofile abortiv infizierter BHK21-Zellen sowie von sechs Ad12-induzierten Hamstertumoren bestimmt. Die Veränderungen einer Großzahl zellulärer Gene wurde durch die Nutzung von Mausgenmicroarrays, auf die circa 1.980 Mausgene mit einer Homologie zwischen 87 und 96% zu Hamstergenen aufgebracht waren, erfasst. Die zellulären Expressionsprofile Ad12-infizierter BHK21-Zellen zeigten

nur geringe Veränderungen. Lediglich zwei Gene scheinen von der Infektion betroffen zu sein: das CD68 Antigen, ein Gen, das eine Funktion in der Zell-Zelladhäsion hat, und das Capping Protein beta 1, ein Protein des Cytoskellets.

Die Analyse von sechs Ad12-induzierten Hamstertumoren zeigte Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den zellulären Transkriptionsprofilen. Von 1.980 untersuchten zellulären Genen werden insgesamt 19 Gene in allen sechs Tumoren exprimiert. Dazu gehören neben einigen Haushaltsgenen auch Transkriptionsaktivatoren sowie RNA-prozessierende Gene. Noch höher liegt die Zahl bei den Arrays, auf die krebsspezifische Gene aufgebracht waren. 47 Gene werden in den drei Tumoren exprimiert, deren cDNAs gegen die auf die Arrays aufgebrachte DNA hybridisiert wurden.

Die Infektion von BHK21-Zellen mit Ad12 verläuft abortiv. Um diesen Replikationsblock zu überkommen, wurde das Gen für den menschlichen Coxsackie und Adenovirusrezeptor (hCAR) in BHK21-Zellen transfiziert, und anschließend wurden die Zellen mit Ad12 infiziert. Radioaktives metabolisches Markieren mit ^{33}P -Orthophosphat der in diesen Zellen synthetisierten DNA zeigte Meßspitzen, die neu synthetisierte Ad12-DNA indizierte. Allerdings erbrachten anschließend durchgeführte Plaque Assays bisher unschlüssige Resultate. Es ist zu Zeit noch nicht eindeutig geklärt, ob die Transfektion von hCAR in BHK21-Zellen dafür ausreicht, über die Ad12 DNA Synthese hinaus auch zur Neubildung infektiöser Ad12 Partikel zu führen.

7 Literaturverzeichnis

Bablanian R, Eggers HJ, Tamm I. Studies on the mechanism of polio-induced cell damage. The relation between poliovirus-induced metabolic and morphologic alteration in cultured cells. *Virology*, 1965, **26**: 100-113.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 1976, **72**: 248-54.

Brown DT, Westphal M, Burlingham BT, Winterhoff U, Doerfler W. Structure and composition of the adenovirus type 2 core. *J Virol.*, 1975, **16(2)**: 366-87.

Brüggemann U, Klenk HD, Doerfler W. Increased infectivity of extracellular adenovirus type 12. *J Virol.*, 1985, **55(1)**: 117-25.

Burnette WN. "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.*, 1981, **112(2)**: 195-203.

Chen RH, Fuggle SV. In situ cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression. *Am. J. Path.*, 1993, **143**: 1527-1534.

Doerfler W. The fate of the DNA of adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1968, **60**: 636-643.

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

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

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

Doerfler W, Burlingham. Three size-classes of intracellular adenovirus deoxyribonucleic acid. *J. Virol.*, 1971, **7**: 707-719.

Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med.*, 1954, **99(2)**: 167-82.

-
- Dunker R, Brown DT. Tubular subviral structure produced in adenovirus-infected KB cells. *J Virol.*, 1979, **31(2)**: 568-74.
- Endter C, Dobner T. Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2004, **273**: 163-214.
- Facchetti F, Bertalot G, Grigolato PG. KP1 (CD68) staining of malignant melanomas. *Histopathology*, 1991, **19**: 141-145.
- Fanning E, Baczko K, Sutter D, Doerfler W. Selectivity in the integration of viral DNA in cells infected and transformed by Adenovirus. *Monograph*, 1978, **26**: 81-94.
- Freifelder D, Better M. Dialysis of small samples in agarose gels. *Anal Biochem.* 1982 Jun; **123(1)**:83-5.
- Ge R, Kralli A, Weinmann R, Ricciardi RP. Down-regulation of the major histocompatibility complex class I enhancer in adenovirus type 12-transformed cells is accompanied by an increase in factor binding. *J Virol.*, 1992, **66(12)**: 6969-78.
- Gey GO , et al. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 1952, **12**: 264-265.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1973, **51**: 1417-1423.
- Graham FL, Rowe DT, McKinnon R, Bacchetti S, Ruben M, Branton PE. Transformation by human adenoviruses. *J Cell Physiol Suppl.*, 1984, **3**: 151-63.
- Green M. Oncogenic viruses. *Annu. Rev. Biochem.*, 1970, **39**: 701-756.
- Green M, Wold WS, Mackey JK, Rigden P. Analysis of human tonsil and cancer DNAs and RNAs for DNA sequences of group C (serotypes 1, 2, 5, and 6) human adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1979, **76(12)**: 6606-10.
- Haberer K. Measurements of beta activities in aqueous samples utilizing Cerenkov radiation. *Packard Technical Bulletin* 16, 1966.
- Hilger-Eversheim K, Doerfler W. Clonal origin of adenovirus type 12-induced hamster tumors: nonspecific chromosomal integration sites of viral DNA. *Cancer Res.*, 1997, **15**: 3001-3009.
- Hilleman MR, Werner JH. Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 1954, **85**: 183-188.

-
- Hohlweg U, Hösel M, Dorn A, Webb D, Hilger-Eversheim K, Remus R, Schmitz B, Buettner R, Schramme A, Corzilius L, Niemann A, Doerfler W. Intra-peritoneal dissemination of Ad12-induced undifferentiated neuroectodermal hamster tumors: de novo methylation and transcription patterns of integrated viral and of cellular genes. *Virus Res.*, 2003, **98(1)**: 45-56.
- Hösel M, Webb D, Schroer J, Schmitz B, Doerfler W. Overexpression of the adenovirus type 12 (Ad12) pTP or E1A gene facilitates Ad12 DNA replication in nonpermissive BHK21 hamster cells. *J Virol.*, 2001, **75(21)**: 10041-53.
- Hösel M, Webb D, Schroer J, Doerfler W. The abortive infection of Syrian hamster cells with human adenovirus type 12. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2003, **272**: 415-40.
- Huebner RJ, Casey MJ, Chanock RM, Schell K. Tumors induced in hamsters by a strain of adenovirus type 3. Sharing of tumor antigens and "neoantigens" with those produced by adenovirus type 7 tumors. *Proc- Natl. Acad. Sci.*, 1965, **52**: 1333-1340.
- Huebner RJ, Rowe WP, Lane TW. Oncogenic effects in hamsters of human adenoviruses types 12 and 18. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1962, **48**: 2051-2058.
- Huvent I, Cousin C, Kiss A, Baroni de Moraes MT, Bernard C, D'Halluin JC. Downregulation of major histocompatibility complex class I expression and susceptibility to natural killer cells in cells transformed with the oncogenic adenovirus 12 are regulated by different E1A domains. *Cancer Detect Prev.*, 1997, **21**: 12-21.
- de Jong JC, Wigand R, Adrian, Hierholzer JC, Kapsenberg JG, Muzerie CJ, Wermenbol AG. Adenovirus 38: a new human adenovirus species of subgenus D. *Intervirology*, 1984, **22**: 164-169.
- Kaiser AD, Hogness DS. The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J Mol Biol.*, 1960, **2**: 392-415.
- Kireeva ML, Lam SC, Lau LF. Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product Cyr61 is mediated through integrin $\alpha v\beta 3$. *J Biol Chem.*, 1998, **273(5)**: 3090-6.
- Klimkait T, Doerfler W. Adenovirus types 2 and 5 functions elicit replication and late expression of adenovirus type 12 DNA in hamster cells. *J Virol.*, 1985, **55(2)**: 466-74.
- Klimkait T, Doerfler W. 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*, 1987, **161(1)**: 109-20.

-
- Kuhlmann I, Achten S, Rudolph R, Doerfler W. 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.*, 1982, **1**: 79-86.
- Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res.*, 1999, **248(1)**: 44-57.
- Logeat F, Israel N, Ten R, Blank V, Le Bail O, Kourilsky P, Israel A. Inhibition of transcription factors belonging to the rel/NF-kappa B family by a transdominant negative mutant. *EMBO J.*, 1991, **10(7)**: 1827-32.
- Lonberg-Holm K, Crowell RL, Philipson L. Unrelated animal viruses share receptors. *Nature*, 1976, **259(5545)**: 679-81.
- Mackey JK, Green M, Wold WS, Rigden P. Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J Natl Cancer Inst.*, 1979, **62(1)**: 23-6.
- Meier O, Greber UF. Adenovirus endocytosis. *J Gene Med.*, 2004, **6(1)**: 152-63.
- Mende Y, Schneider PM, Baldus SE, Doerfler W. PCR-screening of human esophageal and bronchial cancers reveals absence of adenoviral DNA sequences. *Virus Res.*, 2004, **104(1)**: 81-5.
- Meraro D, Gleit-Kielmanowicz M, Hauser H, Levi BZ. IFN-stimulated gene 15 is synergistically activated through interactions between the myelocyte/lymphocyte-specific transcription factors, PU.1, IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein, and IFN regulatory factor-4: characterization of a new subtype of IFN-stimulated response element. *J Immunol.*, 2002, **168(12)**: 6224-31.
- Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet*, 2005, 365(9458): 488-92.
- Nathans D, Smith HO. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.*, 1975, **44**: 273-293.
- Ogawa E, Elliott WM, Hughes F, Eichholtz TJ, Hogg JC, Hayashi S. Latent adenoviral infection induces production of growth factors relevant to airway remodeling in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 2004, **286(1)**: L189-97.
- Pfeffer A, Schubbert R, Orend G, Hilger-Eversheim K, Doerfler W. Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res.*, 1999, **59(1)**: 113-27.

- Philipson L, Lonberg-Holm K, Pettersson U. Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J Virol.*, 1968, **2(10)**: 1064-75.
- Philipson L, Pettersson U. Structure and function of virion proteins of adenoviruses. *Prog Exp Tumor Res.*, 1973, **18**: 1-55.
- Planque N, Perbal B. A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumourigenesis. *Cancer Cell Int.*, 2003, **3(1)**: 15.
- Pope JH, Rowe WP. Immunofluorescent studies of adenovirus 12 tumors and of cells transformed or infected by adenoviruses. *J. Exp. Med.*, 1964, **120**: 577-587.
- Proffitt JL, Sharma E, Blair GE. Adenovirus 12-mediated down-regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I promoter: identification of a negative regulatory element responsive to Ad12 E1A. *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**: 4779-4788.
- Rosahl T, Doerfler W. Alterations in the levels of expression of specific cellular genes in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virus Res.*, 1992, **26(1)**: 71-90.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 1953, **84**: 570-573.
- Santamaria I, Velasco G, Pendas AM, Paz A, Lopez-Otin C. Molecular cloning and structural and functional characterization of human cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain. *J Biol Chem.*, 1999, **274(20)**: 13800-9.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, **239**: 487-491.
- Scheidtmann KH, Ortin J, Doerfler W. Transcription of the genome of adenovirus type 12. Viral mRNA in productively infected KB cells. *Eur J Biochem.*, 1975, **58(2)**: 283-90.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270**: 467-470.
- Schiedner G, Schmitz B, Doerfler W. Late transcripts of adenovirus type 12 DNA are not translated in hamster cells expressing the E1 region of adenovirus type 5. *J Virol.*, 1994, **68(9)**: 5476-82.
- Shiroki K, Toth M. Activation of the human beta interferon gene by the adenovirus type 12 E1B gene. *J. Virol.*, 1988, **62**: 325-330.

- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 1975, **98**: 503-517.
- Sprenkel J, Schmitz B, Heuss-Neitzel D, Zock C, Doerfler W. Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis. *J Virol.*, 1994, **68(1)**: 379-89.
- Stillman B. Functions of the adenovirus E1B tumour antigens. *Cancer Surv.*, 1986, **5(2)**: 389-404.
- Stoker M, Macpherson I. Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives. *Nature*, 1964, **203**: 1355-1357.
- Strohl WA, Rouse HC, Schlesinger RW. 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*, 1966, **28**: 645-658.
- Timmers HT, De Wit D, Bos JL, Van der Eb AJ. E1A products of adenoviruses reduce the expression of cellular proliferation - associated genes. *Oncogene Res.*, 1988, **3**: 67-76.
- Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G. The quest for human cancer viruses. *Science*, 1962, **137**: 835-849.
- Vertegaal AC, Kuiperij HB, van Laar T, Scharnhorst V, van der Eb AJ, Zantema A. cDNA micro array identification of a gene differentially expressed in adenovirus type 5- versus type 12-transformed cells. *FEBS Lett.*, 2000, **487(2)**: 151-155.
- Virtanen A, Pettersson U. Organization of early region 1B of human adenovirus type 2: identification of four differentially spliced mRNAs. *J Virol.*, 1985, **54(2)**: 383-91.
- Wadell G, Hammarskjöld ML, Winberg G, Varsanyi TM, Sundell G. Genetic variability of adenoviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1980, **354**: 16-42.
- Webb D. Abortive Infektion von Hamsterzellen mit menschlichem Adenovirus Typ12: Untersuchungen zur frühen Infektionsphase und Komplementierung des DNA-Replikationsblockes. Köln, 2004.
- Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol.*, 1972, **26 PtC**: 3-27.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 1993, **73(2)**: 309-19.
- Wigand R, Bartha A, Dreizin RS, Esche H, Ginsberg HS, Green M, Hierholzer JC, Kalter

SS, McFerran JB, Pettersson U, Russel WC, Wadell G. Adenoviridae: second report. *Intervirology*, 1982, **18**: 169-176.

Wigand R, Keller D, Werling I. Immunological relationship among human adenoviruses of subgenus D. *Arch. Virol.*, 1982, **72**: 199-209.

Williams J, Williams M, Liu C, Telling G. Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 1995, **199 (Pt 3)**: 149-75.

Wold WS, Mackey JK, Rigden P, Green M. Analysis of human cancer DNA's for DNA sequence of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B1. *Cancer Res.*, 1979, **39(9)**: 3479-84.

Wold WS, Doronin K, Toth K, Kuppuswamy M, Lichtenstein DL, Tollefson AE. Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. *Curr Opin Immunol.*, 1999, **11(4)**: 380-6.

Zhao H, Granberg F, Elfineh L, Pettersson U, Svensson C. Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J Virol.*, 2003, **77(20)**: 11006-15.

8 Anhang

8.1 Kurzzusammenfassung

Die Infektion menschlicher Zellen mit Adenovirus Typ 12 (Ad12) verläuft produktiv, während sie in Hamsterzellen abortiv verläuft. In der vorliegenden Arbeit benutzten wir die DNA Microarraytechnik, um die Transkriptionsprofile zellulärer Gene nach einer Infektion mit Ad12 zu bestimmen. Die Microarraydaten wurden für 13 zelluläre Gene, die signifikante Änderungen nach der Ad12-Infektion zeigten, durch quantitative real-time PCR validiert. 12 h p.i. werden die zellulären Immunantwortgene G1P2, IFIT1 und IFIT2 zwischen 10- und 30-fach im Vergleich zu schein-infizierten Zellen nach oben reguliert. Zu späteren Zeitpunkten der Infektion, wenn die Mehrheit der regulierten Gene abgeschaltet wurde, zeigen eine begrenzte Anzahl zellulärer Gene eine erhöhte Transkriptionsaktivität im Bereich von Faktor 3 oder weniger. Diese Gene gehören zu den Klassen der Signaltransduktionsgene, Regulatoren der Transkription oder sind bei der Proteindegradation involviert. Der eukaryontische Translationsinitiationsfaktor 4 ist hochreguliert, und eines der zum Major Histocompatibility Komplex gehörenden Gene ist negativ reguliert. Für zwei der Gene, dem hochregulierten CTSE-Gen und dem herunterregulierten CYR61-Gen, wurden die transkriptionellen Veränderungen auch auf der Proteinebene durch Westerntransferanalysen bestätigt. Zusätzlich wurden die Transkriptionsprofile abortiv infizierter BHK21-Zellen sowie sechs Ad12-induzierter Hamstertumore bestimmt. Die Veränderungen einer Großzahl zellulärer Gene wurde durch die Nutzung von Mausgenmicroarrays, auf die circa 1.980 Mausgene mit einer Homologie zwischen 87 und 96% zu Hamstergenen aufgebracht waren, erfasst. Die zellulären Expressionsprofile Ad12-infizierter BHK21-Zellen zeigten keine signifikanten Veränderungen. Die verschiedenen Ad12-induzierten Tumore zeigten Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Transkription zellulärer Gene aus verschiedenen Genklassen. Um den Replikationsblock von Ad12 in BHK21-Zellen zu überkommen, wurde der menschliche Coxsackie und Adenovirusrezeptor (hCAR) in BHK21-Zellen transfiziert und anschließend wurden die Zellen mit Ad12 infiziert. Radioaktives metabolisches Markieren mit ^{33}P -Orthophosphat der in diesen Zellen synthetisierten DNA zeigte Meßspitzen, die neu synthetisierte Ad12-DNA indizierte. Allerdings erbrachten anschließend durchgeführte Plaque Assays bisher unschlüssige Resultate. Es ist zu Zeit noch nicht eindeutig geklärt, ob die Transfektion von hCAR in BHK21-Zellen dafür ausreicht, über die Ad12 DNA Synthese hinaus auch zur Neubildung infektiöser Ad12 Partikel zu führen.

8.2 Abstract

The infection of human cells with adenovirus type 12 (Ad12) is productive, while rodent hamster cells are infected abortively. In the present study, we used the DNA microarray technique to determine the transcriptional activity profiles of cellular genes upon infection with Ad12. The microarray data were validated by quantitative real-time PCR for 13 genes which showed significant alterations after Ad12 infection. At 12 h postinfection, there is a 10- to 30-fold up-regulation in the expression of the G1P2, IFIT1, and IFIT2 cellular immune response genes compared to mock-infected cells. At later stages of infection, when the majority of regulated genes has been turned down, a limited number of cellular genes exhibit increased activities by factors of 3 or less. These genes belong to the signal transduction or transcriptional regulator classes or are active in protein degradation. The eucaryotic translation initiation factor 4 is up-regulated, and one of the major histocompatibility complex genes is diminished in activity. For two of the genes, one up-regulated (CTSF gene) and one down-regulated (CYR61 gene), alterations were confirmed at the protein level by Western blotting experiments. In addition, transcriptional activity profiles were determined for abortively infected BHK21 cells and in six Ad12-induced hamster tumors. The cellular expression profiles of Ad12 abortively infected BHK21 cells showed only minor differences. Changes in the transcription of a large number of cellular genes was assessed by using mouse gene microarrays including about 1.980 different mouse genes with 87-96% homology to hamster genes. Similarities and differences existed in the transcription of cellular genes of different functional classes among the different Ad12-induced tumors. These alterations may be an important parameter in the oncogenic transformation by Ad12. To overcome the replication block of Ad12 in BHK21 cells, the gene for the human Coxsackie and Adenovirus receptor (hCAR) was transfected into BHK21 cells, and subsequently the cells were infected with Ad12. In this complemented BHK21 cell system, Ad12 DNA replication, late viral gene transcription and virion protein synthesis are facilitated to a limited extent. It is, however, not yet clear whether infectious virions can be produced. Plaque assay experiments rendered equivocal results mainly due to the background of persisting parental virions. The data from metabolic labeling procedures cannot yet be definitely interpreted.

8.3 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:

Dorn A, Zhao H, Granberg F, Hösel M, Webb D, Svensson C, Pettersson U, Doerfler W. Identification of specific cellular genes up-regulated late in adenovirus type 12 infection. *J Virol.*, 2005, **79(4)**: 2404-12.

Hohlweg U, Dorn A, Hösel M, Webb D, Buettner R, Doerfler W. Tumorigenesis by adenovirus type 12 in newborn Syrian hamsters. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2004, **273**: 215-44.

Hohlweg U, Hösel M, Dorn A, Webb D, Hilger-Eversheim K, Remus R, Schmitz B, Buettner R, Schramme A, Corzilius L, Niemann A, Doerfler W. Intraperitoneal dissemination of Ad12-induced undifferentiated neuroectodermal hamster tumors: de novo methylation and transcription patterns of integrated viral and of cellular genes. *Virus Res.*, 2003, **98(1)**: 45-56.

Webb D, Hösel M, Dorn A, Schmitz B, Auerochs S, Doerfler W. Early steps in the interaction of adenovirus type 12 with permissive human and non-permissive hamster cells. *J Virol.*, 2005, under revision.

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

Erlangen, den

8.4 Lebenslauf

Andreas Dorn

Geburtsdatum: 13.01.1973

Staatsbürgerschaft: deutsch

Ausbildung:

1979 - 1983 Besuch der städtischen Grundschule Dormagen

1983 - 1992 Besuch des Bettina-von-Arnim-Gymnasiums in Dormagen

1992 - 1993 Ableistung des Grundwehrdienstes in Schwalmstadt

Oktober 1993 - Dezember 2001 Studium der Biologie:

- an der biologischen Fakultät der Universität zu Köln,
Fachrichtung Genetik.

- Studienschwerpunkte: Genetik, Entwicklungsbiologie, Biochemie

- Diplomarbeit im Institut für Genetik der Universität zu Köln,
Abteilung med. Genetik und Virologie, Prof. Dr. Walter Doerfler.

Thema: Untersuchungen der zellulären Genexpression verschiedener Zelllinien und Gewebe nach der Infektion mit Adenovirus Typ 12.

Abschluß: Diplombiologe

Dezember 2001 - Mai 2005

Promotion als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen bei Prof. Dr. Walter Doerfler.

wissenschaftliche Projekte:

- Untersuchungen zu Expressionsmustern zellulärer Gene nach Infektion mit Adenovirus Typ 12
- Untersuchung zellulärer Transkriptionsprofile Ad12-induzierter Hamstertumore

Erlangen, den 4. Mai 2005

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Walter Doerfler, bedanken, der mir die Möglichkeit gab, in seinem Labor diese Dissertation anzufertigen. Ich bedanke mich für die vielen Gespräche, Anregungen und Diskussionen, die mir stets weitergeholfen haben. Auch für die Kongressbesuche im In- und Ausland, die er mir ermöglicht hat, und die sehr viel Spass und neue Einblicke in die Virologie gebracht haben, möchte ich mich bedanken.

Auch Herrn Prof. Bernhard Fleckenstein möchte ich gern danken für die Möglichkeit, meine Dissertation im Institut für Klinische und Molekulare Virologie fertigzustellen. Neben einem hervorragend organisierten Institut, haben mir vor allem die Seminare immer sehr gut gefallen. Ich bedanke mich auch für die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit wahrscheinlich nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Ulf Pettersson aus Uppsala, der mir die Möglichkeit gab, für vier Monate in dieser wunderschönen Stadt in seinem Labor zu arbeiten. Bei Prof. Catharina Svensson, Dr. Hongxing Zhao und Fredrik Granberg bedanke ich mich dafür, daß sie mich so herzlich in Schweden aufgenommen haben und mir während meines gesamten Aufenthalts hilfreich zur Seite standen. Desweiteren bedanke ich mich bei der European Science Foundation, die mir diesen Aufenthalt in Schweden ermöglicht hat.

Bei Norbert Hochstein, Holger Brondke und Sabrina Auerochs möchte ich mich für schöne Zeit im Labor bedanken. In ein neues Labor umzuziehen, war sicherlich nicht leicht, doch ich denke, wir haben uns nicht schlecht angestellt. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Instituts hier in Erlangen. Ihr habt es uns leicht gemacht, hier Fuß zu fassen, auch wenn wir Rheinländer einige komische Bräuche haben (Kölle Alaaf!). Auch meinen ehemaligen Laborkollegen aus Köln danke ich für das gute Arbeitsklima während all der Jahre.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Ihr habt mir die Möglichkeit gegeben, Biologie zu studieren. Ihr ward immer für mich da und habt mich in allen Bereichen jederzeit unterstützt. Dafür möchte ich mich bedanken.

Mein größter Dank gilt Frau Birte Borchling, die mir seit nun fast einem Jahr immer zur Seite steht. Sie brachte mir immer das nötige Verständnis und den Halt für das Gelingen dieser Arbeit entgegen, gerade in den letzten Wochen. Dafür, mein Schatz, möchte ich mich bei Dir bedanken!