

Der epigenetische Status eines adenoviralen Transgenoms in Hamsterzellen

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

vorgelegt von
Norbert Hochstein
aus Schmallenberg

Erlangen im Dezember 2006

Berichterstatter: Prof. Dr. Walter Doerfler
Prof. Dr. Jens Brüning
Prof. Dr. Ulf Pettersson

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Helmut Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
A. Einleitung	1
A.1. Epigenetik	1
A.2. DNA-Methylierung	1
A.3. DNA-Methyltransferasen	3
A.4. Chromatin-Organisation	6
A.5. Der Histon-Code	7
A.6. Die Abschaltung von Genen	8
A.7. X-Chromosom-Inaktivierung	9
A.8. Genomische Prägung	10
A.9. Krebsentstehung	11
A.10. Embryonalentwicklung	12
A.11. Integration fremder DNA in Wirtsgenome	14
B. Zielsetzung der Arbeit	16
C. Material	18
C.1. Chemikalien	18
C.2. Lösungen, Puffer, Medien	20
C.3. Radioisotop	23
C.4. Plasmide	23
C.5. PCR-Primer	24
C.6. Antikörper	25
C.7. Zelllinien	25
C.8. Bakterienstamm	25
C.9. DNA-Größenmarker	26
C.10. Enzyme	26
C.10.1. <i>Restriktionsendonukleasen</i>	26
C.10.2. <i>sonstige Enzyme</i>	26
C.11. Laborgeräte	26
C.12. Labormaterialien	28
C.13. Kits und Reagiersysteme	29

D.	Methoden	30
D.1.	Zellkultur	30
D.2.	Virusproduktion	30
D.2.1.	<i>Inokulation von Zellen mit Viren</i>	30
D.2.2.	<i>Virusreinigung</i>	31
D.2.3.	<i>Bestimmung von Viruskonzentrationen</i>	31
D.3.	DNA-Präparation	31
D.4.	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	31
D.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
D.6.	Klonierungen	32
D.7.	DNA-Sequenzierung	32
D.8.	Southern-Transfer-Analysen	32
D.9.	RNA-Präparation	33
D.10.	cDNA-Synthese	34
D.11.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	34
D.12.	Bestimmung von DNA-Methylierungsmustern	37
D.12.1.	<i>Bisulfit-Konversion genomischer DNA zur Analyse von Methylierungsmustern</i>	37
D.12.2.	<i>Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit</i>	37
D.12.3.	<i>Polymerase-Kettenreaktion Bisulfit-behandelter DNA</i>	38
D.12.4.	<i>Bestimmung von 5-Methyl-Cytosinen</i>	39
D.13.	Chromatin-Analysen	39
D.13.1.	<i>Micrococcus-Nuklease-Behandlung von kultivierten Zellen</i>	39
D.13.2.	<i>Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)</i>	39
E.	Ergebnisse	41
E.1.	Die Struktur und Sequenz des Ad12-Transgenoms in der revertanten Zelllinie TR12	41
E.2.	Analyse der Methylierungsmuster	43
E.3.	Methylierungsmuster des Ad12-Transgenoms in der revertanten Zelllinie TR12	44
E.4.	Methylierungsmuster in ausgewählten Bereichen des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie T637	47
E.5.	Kontrollexperimente zur Methylierungsmusteranalyse	48

E.6.	Micrococcus-Nuklease-Sensitivität der Ad12-Transgenome und ihrer Umgebung in den Zelllinien T637 und TR12	50
E.7.	Transkription der integrierten Ad12-Gene und Bezug zu DNA-Methylierungsmustern in den Zelllinien T637 und TR12	52
E.8.	Histon-Modifikationen in den Ad12-Transgenomen der Zelllinien T637 und TR12	56
F.	Diskussion	60
F.1.	Struktur des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie TR12	60
F.2.	Methylierungsmuster des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie TR12	61
F.3.	De novo Methylierung und Stabilität integrierter DNA	61
F.4.	Selektivität der de novo Methylierung	63
F.5.	Transkription integrierter Gene und DNA-Methylierung in Ad12-Promotorregionen der Zelllinien T637 und TR12	63
F.6.	Nukleosomen-Struktur und Histon-Modifikationen der Ad12-Transgenome in den Zelllinien T637 und TR12 und ihrer Umgebung ...	64
G.	Zusammenfassung	67
H.	Abstract	69
I.	Literaturverzeichnis	71
J.	Anhang	83
J.1.	hCAR-enhanced Entry of Adenovirus Type 12 (Ad12) into Non-permissive Hamster Cells Proves a Necessary but not Sufficient Precondition for Viral Replication	83
J.2.	PCR-Primer zur Methylierungsmusteranalyse	108
J.3.	Erklärung	114
J.4.	Lebenslauf	115
J.5.	Danksagung	116

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematisches Diagramm der Konvertierungsreaktion von Cytosinen zu Uracilen durch Natrium-Bisulfit.	2
Abb. 2	Die drei Klassen der DNA-Methyltransferasen bei Säugetieren.	4
Abb. 3	Chromatin-Organisation und Histon-Modifikationen.	6
Abb. 4	Histon-Modifikationen.	7
Abb. 5	Mechanismen DNA-Methylierungsvermittelter Genabschaltung.	8
Abb. 6	Zusammenspiel von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen zur transkriptionellen Abschaltung von Genen.	9
Abb. 7	Zusammenfassung von Sequenzen, die häufig von krebspezifischen DNA-Hyper- oder Hypomethylierungen betroffen sind.	11
Abb. 8	Elternspezifische Methylierung in frühen Embryonen von Mäusen.	13
Abb. 9	Mögliche Signale für eine de novo Methylierung von verschiedenen Transgenen.	15
Abb. 10	Bestimmung des Schwellwertzyklus C_t bei qPCRs.	35
Abb. 11	Standardkurve einer qPCR.	35
Abb. 12	Identifizierung von zusätzlichen DNA-Fragmenten zur Charakterisierung der Verbindungsstelle von adenoviraler zu adenoviraler DNA in der Zelllinie TR12 und Lokalisation der DNA-Hybridisierungs sonden im Ad12-Genom.	41
Abb. 13	Schema des Transgenoms und der Integrationsstelle in der Zelllinie TR12.	42
Abb. 14	Nomenklatur der Methylierungsmusteranalyse.	44
Abb. 15	Vollständiges Methylierungsmuster des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie TR12.	45

Abb. 16	Methylierungsmuster des linken und rechten Endes der integrierten adenoviralen DNA in der Zelllinie TR12.	46
Abb. 17	Methylierungsmuster von drei PCR-Fragmenten aus den Bereichen Hexon, Terminales Protein und E2-Promotor der Zelllinie TR12.	47
Abb. 18	Kontrollen der Methylierungsmusteranalyse (I).	48
Abb. 19	Kontrollen der Methylierungsmusteranalyse (II).	49
Abb. 20	Organisation des Chromatins im Ad12 Transgenom und seiner Umgebung im zellulären Genom.	51
Abb. 21	Bestimmung der Transkription des adenoviralen E1B-Gens in den Zelllinien T637 und TR12 durch qPCR.	53
Abb. 22	qPCR-Standardkurve bei der Bestimmung der Transkription des adenoviralen E1B-Gens.	53
Abb. 23	Dissoziationskurve zur Überprüfung der Spezifität von qPCR-Produkten des adenoviralen E1B-Gens.	54
Abb. 24	Gegenüberstellung von Methylierungsmustern in ausgewählten Ad12-Bereichen und Transkriptionsraten adenoviraler Gene in den Zelllinien T637 und TR12.	55
Abb. 25	Beispiel zur Bestimmung der Histon-Modifikationen in Bereichen es adenoviralen Transgenoms in den Zelllinien T637 und TR12.	57
Abb. 26	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) von modifizierten Histonen in verschiedenen Ad12-Promotorregionen der Zelllinien T637 und TR12.	58
Tab. 1	Auswertung der qPCR-Ergebnisse für die Transkription des adenoviralen E1B-Gens in der Zelllinie TR12.	54

Abkürzungsverzeichnis

5-mC	5-Methyl-Cytosin
A	Desoxyadenin-5'-Monohosphat
Ad12	humanes Adenovirus Typ 12
bp	Basenpaare
C	Desoxycytidin-5'-Monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: complementary DNA)
CpG	Dinukleotid aus einem Cytosin- und einem Guanin-Rest
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
engl.	Englisch
G	Desoxyguanin-5'-Monophosphat
g	Erdbeschleunigung (engl.: gravity)
h	Stunde(n)
k	Kilo-
kbp	Kilobasenpaare
M	Molar
μ	Mikro-
m	Milli-
min	Minute(n)
moi	Multiplizität der Infektion (engl.: mutipilcity of infection)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger RNA)
n	Nano-
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	Infektiöse Partikel (engl.: plaque forming units)
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
s	Sekunde(n)
T	Desoxythymidin-5'-Monophosphat
U	Einheit(en) (engl.: unit(s))
ü.N.	über Nacht

A. Einleitung

A.1. Epigenetik

Epigenetische Merkmale sind Prozesse, die nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz vermittelt werden. Jede differenzierte Zelle eines höheren Organismus trägt die gleiche Abfolge der Nukleotide in der DNA wie die Zygote, von der sie abstammen. Eine Ausnahme bilden hier nur Zellen des Immunsystems mit DNA-Umordnungen zur klonalen Antikörperproduktion. Jeder Zelltyp wird durch das gegenwärtige Inventar an Proteinen definiert, welches wiederum von der momentanen Expression der Gene abhängt. Mit Epigenetik werden Systeme beschrieben, die nach der Wortbedeutung der griechischen Vorsilbe „epi“ für „auf“ oder „über“, die genetische Information über die DNA-Sequenz hinaus dynamisch erweitern. Zu diesen Prozessen zählen u.a. die DNA-Methylierung und die Veränderung der Chromatin-Struktur. Zu den wichtigsten Veränderungen der Chromatin-Struktur zählt die Modifikation von Histonen.

A.2. DNA-Methylierung

5-Methyl-Deoxycytosine (5-mC) wurden erstmals in der DNA des Tuberkulose Bakteriums (Johnson und Coghill, 1928) und in DNA aus Kalbsthymus beschrieben (Hotchkiss, 1948). Eine biologische Bedeutung der DNA-Methylierung wurde unabhängig voneinander durch Riggs (Riggs, 1975) sowie Holliday und Pugh (Holliday und Pugh, 1975) diskutiert. Die Hypothesen waren, dass DNA-Methylierung einen starken Effekt auf die Expression von Genen haben kann und Änderungen der DNA-Methylierung während der Entwicklung Gene an- und abschalten können. Weiterhin wurde festgestellt, dass DNA-Methylierung vererbbar ist, wenn es ein Enzym gibt, das den hemimethylierten Zustand kurz nach der Replikation erkennt und so den Methylierungsstatus, und damit die Aktivität eines Gens, weitergeben kann. Eine de novo Methylierung von adenoviraler DNA nach Integration wurde ebenfalls beschrieben (Sutter et al., 1978; Sutter und Doerfler, 1980).

Methylierungsmuster können durch Paare von isoschizomeren Restriktionsendonukleasen, wie HpaII und MspI, analysiert werden. Beide Enzyme erkennen die Sequenz 5'-CCGG-3'. HpaII schneidet die methylierte Sequenz nicht, so dass diese Enzyme zur Bestimmung von Methylierungsmustern eingesetzt werden können (Waalwijk und Flavell, 1978). Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass nur etwa 10-15%, abhängig von der Sequenz, aller CpG-Dinukleotide in einer Erkennungssequenz solcher Restriktionsenzyme liegen. Eine Methode

zur genomischen Sequenzierung machte es möglich, jedes 5-mC in einer DNA-Sequenz zuverlässig zu bestimmen (Church und Gilbert, 1984; Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994). Diese Methode beruht auf der Konversion von Cytosinen, die durch Behandlung einzelsträngiger DNA mit Natrium-Bisulfit zu Uracilen reagieren (Shapiro und Weisgras, 1970; Hayatsu et al., 1970; Wang et al., 1980). Abbildung 1 zeigt die chemische Reaktion, bei der Cytosine zu Uracilen konvertieren, wohingegen 5-Methyl-Cytosine unreaktiv bleiben.

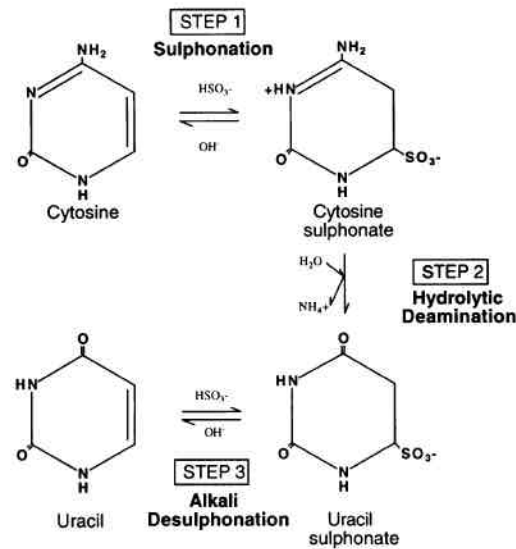


Abbildung 1. Schematisches Diagramm der Konvertierungsreaktion von Cytosinen zu Uracilen durch Natrium-Bisulfit. Die Reaktion verläuft in drei Schritten: (1) Addition von Bisulfit an die 5-6-Doppelbindung des Cytosins, (2) hydrolytische Deaminierung des Cytosin-Bisulfit-Derivats zum Uracil-Bisulfit-Derivat und (3) alkalische Desulphonierung zum Uracil. (Aus: Clark et al., 1994).

In der DNA von Säugetieren werden hauptsächlich Cytosine in der Nukleotidfolge 5'-CG-3' methyliert. Etwa 1% aller DNA-Basen im menschlichen Genom sind 5-mCs, so dass 70 bis 80% aller CpG-Dinukleotide methyliert vorliegen (Ehrlich et al., 1982). CpG-Dinukleotide sind im menschlichen Genom wegen der spontanen Deaminierung von 5-mCs und der daraus resultierenden C-zu-T-Transition um einen Faktor fünf unterrepräsentiert (Laird, 2003). Auch die Verteilung der CpGs ist weder gleichmäßig noch zufällig. CpG-reiche Regionen (CpG-Inseln), die häufig in 5'-regulatorischen Regionen vor Genen gefunden werden (Venter et al., 2001; Lander et al., 2001), sind oft nicht methyliert (Antequera und Bird, 1993). Methylierte DNA findet man meist in heterochromatischen Genomabschnitten wie in zentromerischen Regionen, in repetitiven Elementen und Transposons. DNA-Methylierung und Genaktivität sind häufig invers korreliert (Doerfler, 1981; Vardimon et al., 1982; Doerfler, 1983; Langner et al., 1984). DNA-Methylierung ist an einer Reihe von biologischen Vorgängen, z.B. Embryonalentwicklung, X-Inaktivierung, Regulation der Genexpression, Schutz vor fremder

DNA, genomische Prägung, genetische Krankheiten sowie der Entstehung von Krebs, beteiligt.

A.3. DNA-Methyltransferasen

DNA-Methyltransferasen (DNMTs) etablieren und erhalten DNA-Methylierungsmuster in Säugetieren. Sie katalysieren den Transfer einer Methylgruppe auf das Kohlenstoffatom 5 im Cytosinring. Als Methylgruppen-Donor dient das S-Adenosyl-Methionin. Auf Grund von Sequenzhomologien werden die DNMTs in drei Familien unterteilt: DNMT1, DNMT2 und DNMT3, wobei die dritte Familie drei Mitglieder besitzt: DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L. DNMT1 wurde als Erstes entdeckt (Bestor et al., 1988), da aber ein Funktionsverlust des *Dnmt1*-Gens nicht zu einem Verlust der Methylierung in ES-Zellen von Mäusen führte, wurden weitere DNMTs durch Suche in EST-Datenbanken (engl.: *expressed sequence tag*, exprimierte Sequenzen) gefunden (Okano et al., 1998; Yoder und Bestor, 1998).

Dnmt1 wird stark in proliferierenden Zellen und ubiquitär in somatischen Zellen exprimiert. Hemimethylierte DNA ist ein besseres Substrat für die gereinigte DNMT1 als nicht-methylierte DNA (Yoder et al., 1997a; Pradhan et al., 1999). Die Lokalisierung von DNMT1 in Replikationszentren während der S-Phase des Zellzyklus (Leonhardt et al., 1992) weist auf eine Funktion von DNMT1 bei der Replikation hin. Eine Inaktivierung des *Dnmt1*-Gens bei Mäusen zeigte eine Demethylierung bei allen untersuchten Genen, hatte aber keinen Effekt auf die *de novo* Methylierung von integrierter retroviraler DNA (Li et al., 1992; Lei et al., 1996). Eine Überexpression des *Dnmt1*-Gens ist alleine nicht ausreichend, um eine *de novo* Methylierung in Maus ES-Zellen oder *Drosophila* zu induzieren (Lyko et al., 1999; Chen et al., 2003). Diese Ergebnisse weisen auf eine Funktion der DNMT1 als Instandhaltungs-Methyltransferase hin (engl.: *maintenance methyltransferase*), die bei jeder DNA-Replikation das Methylierungsmuster von etwa 4×10^7 5-mCs (Turek-Plewa und Jagodzinski, 2005) des parentalen DNA-Strangs auf die Tochterzellen überträgt.

DNMTs bestehen aus zwei Domänen: einer hoch konservierten katalytischen Domäne am carboxyterminalen Ende und einer variablen regulatorischen Domäne am aminoterminalen Ende. *Dnmt2* besitzt nur die katalytische Domäne (Abbildung 2, S. 4) und wird in geringen Mengen in vielen humanen und murinen Geweben exprimiert (Yoder und Bestor, 1998). DNMT2 besitzt eine geringe Methyltransferasen-Aktivität und ihr primäres Ziel scheinen Stellen außerhalb von CpG-Dinukleotiden in zentromerischen Strukturen zu sein (Hermann et al., 2003; Kunert et al., 2003; Liu et al., 2003; Tang et al., 2003). Die biologische Funktion

von DNMT2 ist unbekannt und nicht essentiell für die Entwicklung von *Drosophila* (Kunert et al., 2003) und Menschen.

DNMT Klasse	Schematische Struktur	Dnmt Knockout in Mäusen	DNA-Methyltransferasen Aktivität
DNMT1		<ul style="list-style-type: none"> - Embryo letal (E8,5) - Globale Hypomethylierung - Verluste von Prägung 	<ul style="list-style-type: none"> - JA - wichtigste Instandhaltungs-DNMT - de novo Aktivität: möglich, aber gering
DNMT2		<ul style="list-style-type: none"> - Lebensfähige, fruchtbare Mäuse mit geringen Defekten 	<ul style="list-style-type: none"> - JA (gering) - Präferenz für zentromerische Strukturen
DNMT3A		<ul style="list-style-type: none"> - Postnatale Letalität (4 Wochen) - Verlust der de novo Methylierung - Schwere intestinale Defekte - beeinträchtigte Spermatogenese 	<ul style="list-style-type: none"> - JA - de novo Aktivität; vermutlich eine geringe Instandhaltungs-Aktivität
DNMT3B		<ul style="list-style-type: none"> - Embryo letal (E14,5-18,5) - Verlust der de novo Methylierung - Milde Neuralrohr Defekte - Demethylierung von zentromerischen Sequenzrepetitionen 	<ul style="list-style-type: none"> - JA - de novo Aktivität; vermutlich eine geringe Instandhaltungs-Aktivität - Präferenz für kleine Satelliten Wiederholungen
DNMT3L		<ul style="list-style-type: none"> - Lebensfähig; Männchen sind steril (beeinträchtigte Spermatogenese) - Weibchen haben keine fruchtbaren Nachkommen - Verlust von maternaler und paternaler Prägung in Gameten 	<ul style="list-style-type: none"> - NEIN - Kofaktor von DNMT3A (verstärkt die de novo Aktivität)

Abbildung 2. Die drei Klassen der DNA-Methyltransferasen bei Säugetieren. Alle DNMTs bestehen aus einer aminoterminalen regulatorischen Region und einer carboxyterminalen katalytischen Region, DNMT2 fehlt die regulatorische Region und DNMT3L ist katalytisch nicht aktiv. Konservierte Motive sind dargestellt: Cys: cysteinreiche Domäne; PHD: Pflanzenähnliche Homeodomäne (ATRX-ähnlich); PWWP: prolin- und tryptophanreiche Domäne. Die Länge der DNMTs ist in Aminosäuren angegeben. Die dritte Spalte gibt einen Überblick über Phänotypen bei Knockout-Mäusen, die vierte Spalte gibt die Methyltransferasenaktivität wieder. (Ins Deutsche übersetzt aus: Brenner und Fuks, 2006).

DNMT3A und DNMT3B sind sehr homolog, werden aber von verschiedenen Genen auf den Chromosomen 2p23 bzw. 20q11.2 kodiert (Xie et al., 1999). Dnmt3A und Dnmt3B werden im Gegensatz zu Dnmt1 in ES-Zellen des frühen Embryos und in Keimzellen stark exprimiert, sind aber in somatischen Zellen herunterreguliert (Okano et al., 1998). Rekombinante Dnmt3A und Dnmt3B Proteine methylieren hemimethylierte und nicht-

methyliert DNA *in vitro* gleichermaßen (Okano et al., 1998; Aoki et al., 2001). Eine Inaktivierung von Dnmt3A und Dnmt3B verhindert die *de novo* Methylierung in ES-Zellen und im frühen Embryo (Okano et al., 1999). Dnmt3A und Dnmt3L sind für die Etablierung der Prägungen während der Entwicklung von Keimzellen verantwortlich (Bourc'his et al., 2001; Hata et al., 2002; Kaneda et al., 2004b). Eine Überexpression von Dnmt3A und Dnmt3B bewirkt eine *de novo* Methylierung in Säugerzellen oder *Drosophila* (Lyko et al., 1999; Hsieh, 1999; Chen et al., 2003). Diese Ergebnisse weisen auf eine Funktion von DNMT3A und DNMT3B als *de novo* Methyltransferasen zur Etablierung von Methylierungsmustern während der Embryogenese und Gametogenese hin.

DNMT3L weist eine hohe Sequenzhomologie zu DNMT3A und DNMT3B auf, besitzt aber keine aktive katalytische Domäne (Abbildung 2; Aapola et al., 2001; Hata et al., 2002). Die Expressionsmuster von Dnmt3L ähneln denen von Dnmt3A und Dnmt3B während der Mausentwicklung stark (Hata et al., 2002). Homozygote Knockout-Mäuse für Dnmt3L sind zwar lebensfähig, aber die Männchen sind steril und heterozygote Embryos von homozygoten Weibchen sterben in der Gebärmutter mit fehlender maternaler Prägung (Hata et al., 2002). DNMT3L ist ein wichtiger Kofaktor von DNMT3A (Chedin et al., 2002) und so an der genomischen Prägung beteiligt.

DNMT1 wird als Instandhaltungsmethyltransferase und DNMT3A/DNMT3B als *de novo* Methyltransferasen bezeichnet. Neuere Ergebnisse weisen aber eher auf ein Zusammenspiel der Methyltransferasen bei der Aufrechterhaltung von Methylierungsmustern hin. In Krebszellen werden die Methylierungsmuster nicht nur durch die Aktivität von Dnmt1, sondern auch durch ein Zusammenspiel von DNMT1 und DNMT3 (Rhee et al., 2000; Rhee et al., 2002) etabliert. Die Unterdrückung der Expression von Dnmt3A oder Dnmt3B in ES-Zellen hat einen geringen Effekt auf die globale Methylierung in diesen Zellen, wohingegen der Verlust von Dnmt3A und Dnmt3B zu einem Rückgang des Methylierungsgrades führt (Chen et al., 2003). Andererseits ist ein Verlust von Dnmt1 in einigen Krebszellen alleine für eine globale und genspezifische Demethylierung verantwortlich (Robert et al., 2003). Diese Ergebnisse führten zu einem Model, welches DNMT1 als die Haupt-Instandhaltungsmethyltransferase mit hoher Effizienz aber ohne ausgeprägte Genauigkeit bezeichnet. Die *de novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B agieren in diesem Modell als „Korrekturleser“ (Chen et al., 2003).

A.4. Chromatin-Organisation

Nukleosomen sind die grundlegenden, sich wiederholenden Strukturen des Chromatins und bestehen aus 147 bis 240 bp DNA, den vier Histonen des Nukleosomen-Kerns (H2A, H2B, H3 und H4) und dem Verbindungshiston H1. Der Nukleosomen-Kern ist ein Oktamer und besteht aus jeweils zwei der vier Kernhistone. 147 bp DNA sind jeweils in 1,67 Windungen linksgängig um einen Nukleosomen-Kern gewunden (Abbildung 3, B).

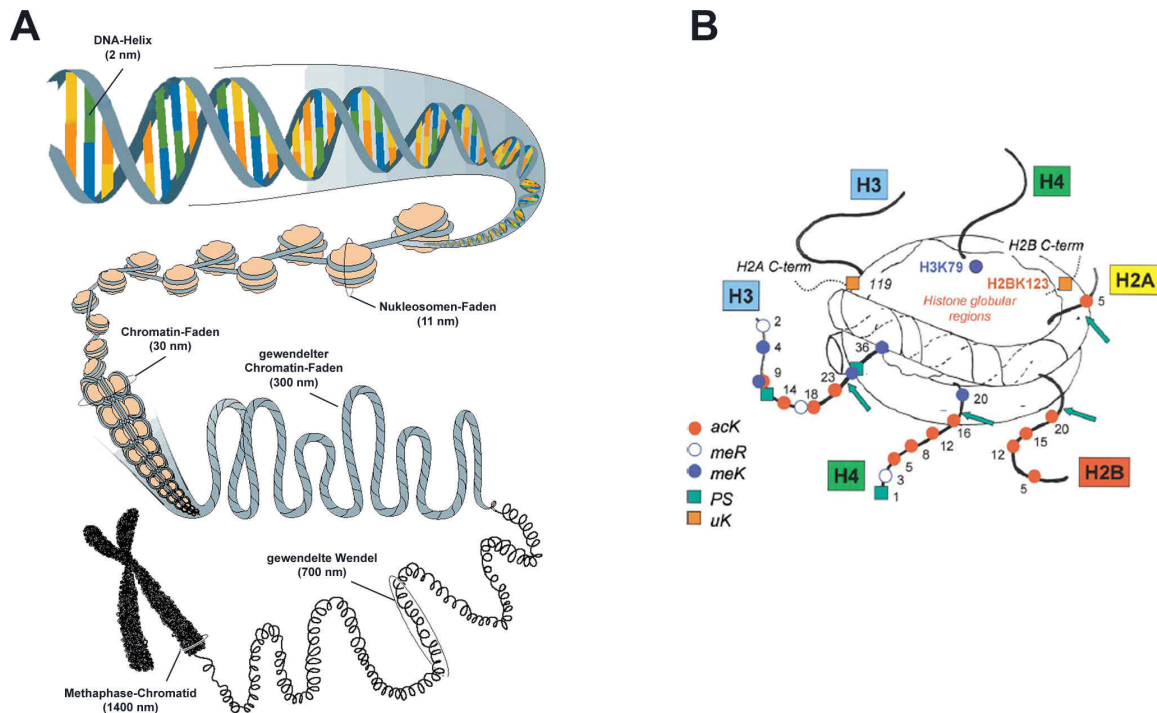


Abbildung 3. Chromatin-Organisation (A) und Histon-Modifikationen (B). Nur sechs von acht aminoterminalen- und zwei carboxyterminale Enden sind gezeigt. Stellen für posttranslationale Modifikationen sind durch Symbole gekennzeichnet (acK: Acetyl-Lysin; meR: Methyl-Arginin; meK: Methyl-Lysin; PS: Phosphoryl-Serin; uK: ubiquitiniertes Lysin). Die Pfeile kennzeichnen Trypsinschnittstellen. Die Darstellung ist eine Zusammenfassung aus verschiedenen Organismen. (Aus: Turner, 2002).

Zwei benachbarte Nukleosomen-Kerne sind durch Verbindungs-DNA (engl.: linker DNA) miteinander verbunden. Diese Verbindungs-DNA kann etwa 10 bis 90 bp lang sein und ist zugänglicher als DNA mit direktem Kontakt zum Nukleosomen-Kern. Jedes Chromosom besteht aus einem einzigen Nukleosomen-Faden. Unter Mithilfe des Verbindungshistons (engl.: linker histone) H1 kann sich der Nukleosomen-Faden zu einer höheren Struktur, dem 30 nm Chromatin-Faden, zusammenlagern. Diese Sekundärstrukturen der Chromosomen können miteinander zu Tertiärstrukturen interagieren (Abbildung 3 A). Die 3D-Strukturen des Chromatins sind im Zellkern nicht statisch sondern dynamisch. In Metaphase-Chromosomen ist der Nukleosomen-Faden stark kondensiert. Während der Interphase ist er fünf Mal

schwächer gepackt (Manders et al., 2003), und das Chromatin des Zellkerns ist in verschiedene funktionelle Domänen unterteilt. Der Übergang zwischen einzelnen Zuständen des Chromatins ist eng mit der Aktivität von Genen verbunden (Eberharter und Becker, 2002). Dieser Übergang wird durch kovalente Modifizierungen der Histone des Histonkerns induziert (Strahl und Allis, 2000).

A.5. Der Histon-Code

Nukleosomen-Kerne bestehen aus einer globulären Domäne mit hoch konservierten aminoterminalen Enden, die flexible Ketten an der Oberfläche der Nukleosomen bilden und posttranslational modifiziert werden können. Solche Modifikationen sind Acetylierungen bestimmter Lysine durch Histon-Acetyltransferasen (HATs), Methylierungen von Lysin- und Argininresten durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) und Phosphorylierungen von Serinen durch Histon-Kinasen (HKs). Weitere Modifizierungen sind Anlagerungen von Ubiquitin, kleinen ubiquitinähnlichen Modifizierern (SUMOs, engl.: **s**mall **u**biquitin-**l**ike **m**odifiers) und Poly(ADP-Ribose) (PAR) (Abbildungen 3 und 4).

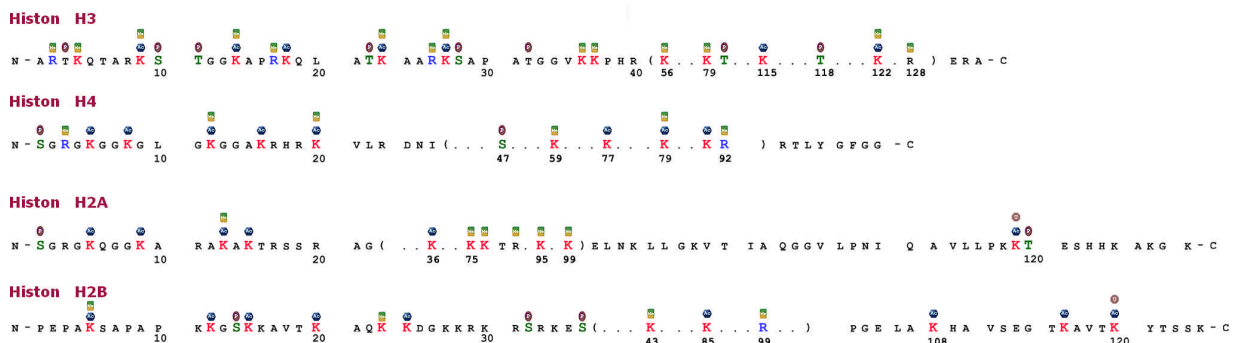


Abbildung 4. Histon-Modifikationen. Stand: 09. März 2006.

Ein Zusammenspiel der verschiedenen Histon-Modifikationen legt funktionale Zustände des Chromatins fest. Eine Hyperacetylierung der Histone H3 oder H4 ist mit einem transkriptionell aktiven und offenen Chromatin-Zustand verbunden (Roth et al., 2001; Eberharter und Becker, 2002). Phosphorylierungen des Histons 3 an Position 10 (Serin) und Methylierungen an Position 4 (Lysin) werden ebenfalls bei aktiven Genen gefunden, wohingegen deacetylierte Histone H3 und H4 und Methylierungen des Histons H3 an Position 9 (Lysin) mit einem reprimierten Zustand von Genen verknüpft sind (Jenuwein und Allis, 2001; Schreiber und Bernstein, 2002). Eine Übersicht der Histon-Modifikationen und ihrer Funktionen findet sich bei Lachner et al., 2003. Die verschiedenen Modifikationen an einem

oder mehreren Histonen agieren kombinatorisch sowie sequenzabhängig und führen zu nachgeordneten Ereignissen. Die Modifikationen werden daher als zelluläres Vokabular benutzt, um verschiedene transkriptionelle Prozesse zu regulieren (Histon-Code Hypothese, Strahl und Allis, 2000).

A.6. Die Abschaltung von Genen

Die Transkription von Genen kann auf zwei Arten durch DNA-Methylierung inhibiert werden: (i) Die Methylgruppen verhindern eine Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an ihre Zielsequenz in regulatorischen Bereichen von Genen (Watt und Molloy, 1988); (ii) Methyl-CpG-Bindeproteine (MBP, engl.: **M**ethyl-**C**p**G**-**b**inding **p**roteins) erkennen methylierte DNA und rekrutieren Moleküle, die die Transkription bzw. Elongation blockieren und die Chromatin-Struktur verändern können (Boyes und Bird, 1991; Abbildung 5).

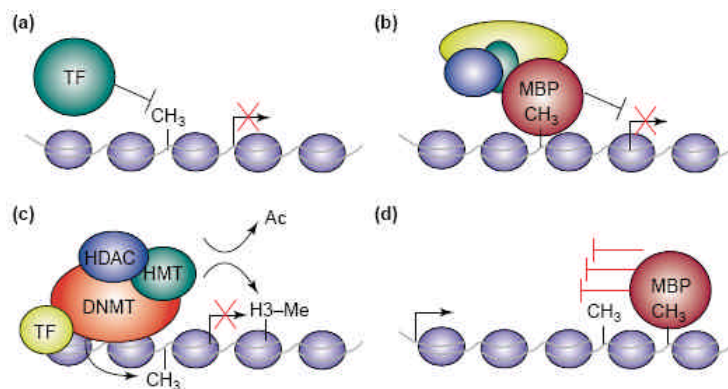


Abbildung 5. Mechanismen DNA-Methylierungsvermittelter Genabschaltung. (a) Direkte Inhibition der Transkription durch Blockierung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren. (b) Methyl-CpG-Bindeproteine erkennen methylierte DNA und rekrutieren Faktoren, die die Transkription verhindern und die Chromatin-Struktur verändern. (c) DNA-Methyltransferasen sind mit Histon-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen verknüpft und methylieren DNA-Sequenzen, die bereits durch Histon-Modifikationen reprimiert sind. (d) Methyl-CpG-Bindeproteine können sich in transkribierten Bereichen von Genen anlagern und so direkt oder durch Veränderungen der Chromatin-Struktur die Transkriptionselongation verhindern. (TF: Transkriptionsfaktor; MBP: Methyl-CpG-Bindeprotein; HDAC: Histon-Deacetylasen; HMT: Histon-Methyltransferasen). (Aus: Klose und Bird, 2006).

Abbildung 6 zeigt ein Beispiel für das Zusammenspiel von Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung bei der Abschaltung von Genen. Deacetylierte Histone und eine Methylgruppe an Aminosäure 9 (Lysin) des Histons H3 (H3K9me) führen zu kondensiertem, transkriptionell nicht aktivem Chromatin. DNA-Methyltransferasen sind mit Histon-Deacetylasen (HDACs) und Histon-Methyltransferasen (HMTs) verknüpft und können so

bereits inaktive Gene methylieren und ausschalten. Im Gegensatz dazu können bereits methylierte DNA-Sequenzen, durch MBPs vermittelt, HDACs und HMTs rekrutieren und so durch Histon-Modifikationen Gene abschalten. DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen können interagieren und sich gegenseitig verstärken, um einen reprimierten Zustand von Genen zu erreichen und aufrecht zu erhalten.

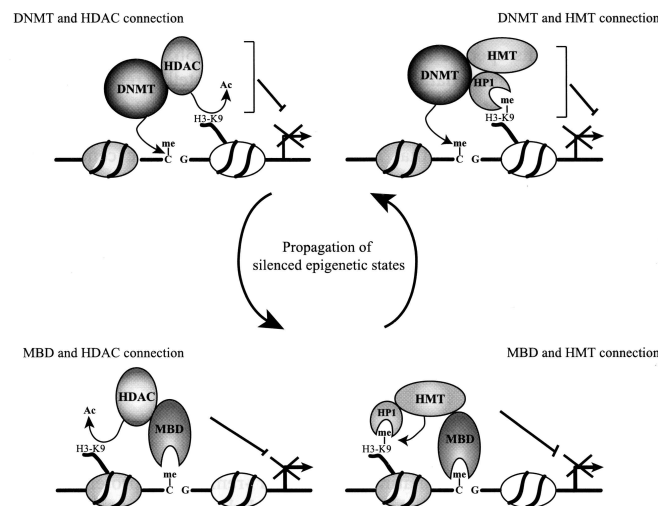


Abbildung 6. Zusammenspiel von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen zur transkriptionellen Abschaltung von Genen. Beschreibung siehe Text. (Aus: Brenner und Fuks, 2006).

A.7. X-Chromosom-Inaktivierung

Die fast vollständige Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen bei weiblichen Säugern ist ein Beispiel für ein chromosomenweites Langzeitabschalten von Genen durch epigenetische Prozesse. Ein X-Chromosom wird früh während der Entwicklung zur Inaktivierung ausgewählt. Dieser inaktive Zustand wird bei somatischen Zellteilungen auf Nachkommenzellen vererbt. 1961 wurde durch Lyon (Lyon, 1961) zum ersten Mal postuliert, dass ein weibliches X-Chromosom inaktiv sei, die Inaktivierung früh in der embryonalen Entwicklung stattfindet und die Auswahl des inaktiven X-Chromosoms zufällig sei. Durch die Inaktivierung wird eine Gendosis-Kompensation ermöglicht, die ein ähnliches Expressionsniveau der Gene auf den Geschlechtschromosomen von männlichen (XY) und weiblichen Säugetieren (XX) erlaubt. Dieser Mechanismus ist einzigartig für Säugetiere. In Fruchtfliegen wird die Dosiskompensation durch verstärkte Expression des einen männlichen X-Chromosoms erreicht (Lucchesi und Manning, 1987), bei Nematoden wird die Expression der beiden weiblichen X-Chromosomen herunterreguliert (Meyer und Casson, 1986, Übersichten bei Blackwell und Walker, 2002; Meller und Kuroda, 2002).

Für den Prozess der X-Inaktivierung ist eine als XIC (engl.: **X** inactivation center, X-Inaktivierungszentrum) bezeichnete Region der X-Chromosomen besonders wichtig (Russell, 1963). In dieser Region befinden sich das XIST-Gen (engl.: **Xi**-specific transcripts, X_{inaktiv} -spezifische Transkripte) und Elemente, die die Expression von XIST regulieren und das zu inaktivierende X-Chromosom bestimmen (Borsani et al., 1991; Brockdorff et al., 1991; Brown et al., 1991). Das XIST-Gen wird nur vom inaktiven weiblichen X-Chromosom exprimiert und nicht von den aktiven männlichen oder weiblichen X-Chromosomen. Das XIST-Genprodukt ist eine 15 kbp lange RNA, die nicht translatiert wird (Brockdorff et al., 1992). Die XIST RNA bleibt mit dem inaktiven X-Chromosom assoziiert und ist für die Heterochromatin-Bildung wichtig (Clemson et al., 1996). Der inaktive Zustand wird durch weitere Faktoren aufrechterhalten, die außerhalb des XIST-Genlocus liegen. Das inaktive X-Chromosom ist durch viele heterochromatische Merkmale gekennzeichnet: Methylierung der CpG-Inseln, hypoacetylierte Histone H3 und H4, Methylierung des Histons H3 an den Lysin-Resten 9 und 27, späte Replikation in der S-Phase des Zellzyklus, Anreicherung der Histon-H2A-Variante macroH2A (Chadwick und Willard, 2003; Heard, 2005) und periphere Lokalisation im Zellkern als Barr-Körperchen (Barr und Bertram, 1949).

A.8. Genomische Prägung

Für eine normale embryonale und postnatale Entwicklung von Säugern sind die väterlichen und mütterlichen Genome notwendig. Die meisten Gene werden biallelisch exprimiert mit der Ausnahme von einigen Genloci, deren Expression von der elterlichen Herkunft abhängt. Die Expression von nur einem elterlichen Allel unterliegt epigenetischen Prozessen wie Chromatin-Struktur, DNA-Methylierung und die Einhaltung von bestimmten Zeiten im Replikationszyklus. Geprägte Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Embryogenese sowie der Entwicklung und sind oft mit genetischen Krankheiten assoziiert, die Zellwachstum, Entwicklung und Verhalten betreffen. Ein Ausfall der Kontrolle von geprägten Genen ist auch bei der Entstehung von Tumoren beteiligt (Übersicht bei Recillas-Targa, 2002).

Die Nukleotid-Sequenz auf Chromosom 15q11-q13 ist ein Beispiel für eine parental geprägte Region im menschlichen Genom. Deletionen in dieser Genregion auf dem mütterlichen oder väterlichen Chromosom führen zu zwei unterschiedlichen klinischen Syndromen. Beim Prader-Willi-Syndrom (PWS) (Prader et al., 1956) ist der väterliche, beim Angelman-Syndrom (AS) (Angelman, 1965) der mütterliche Genlocus deletiert (Ledbetter et al., 1981; Nicholls et al., 1989; Robinson et al., 1991). In 25% (PWS) oder 2% (AS) der Fälle geht das Fehlen des väterlichen bzw. mütterlichen Genlocus auf uniparentale Disomie zurück

(Nicholls, 1994). In 1% der PWS-Patienten und 4% der AS-Patienten ist die Krankheit nicht auf Deletionen oder Chromosomen-Anomalien, sondern auf ein Fehlen der Genprodukte des Prader-Willi/Angelman-Genlocus durch DNA-Methylierung zurückzuführen (Glenn et al., 1993; Sutcliffe et al., 1994; Buiting et al., 1995).

A.9. Krebsentstehung

Ein Funktionsverlust von Tumor-Suppressor-Genen ist bei der Karziogenese vieler Tumorarten beteiligt. Dieser Ausfall kann durch Mutationen in kodierenden Bereichen dieser Gene oder durch epigenetische Genabschaltung verursacht werden. Eine Hypermethylierung der Promotoren von Tumor-Suppressor-Genen und anderen bei der Krebsentstehung beteiligten Gene ist für viele Krebsarten nachgewiesen worden (Überblick bei Baylin und Herman, 2000). Dieser krebsassoziierten Hypermethylierung gingen allerdings Arbeiten voraus, die eine krebsassoziierte Hypomethylierung nachwiesen (Gama-Sosa et al., 1983; Feinberg und Vogelstein, 1983a; Feinberg und Vogelstein, 1983b). Tatsächlich sind mehr Genombereiche von einer Hypomethylierung betroffen als von einer Hypermethylierung, so dass ein Netto-Verlust an 5-mC bei vielen Tumorarten beobachtet werden kann (Gama-Sosa et al., 1983; Überblick bei Ehrlich, 2006).

Abbildung 7 fasst die Genombereiche zusammen, die von einer Hypo- oder Hypermethylierung betroffen sind (aus Ehrlich, 2002).

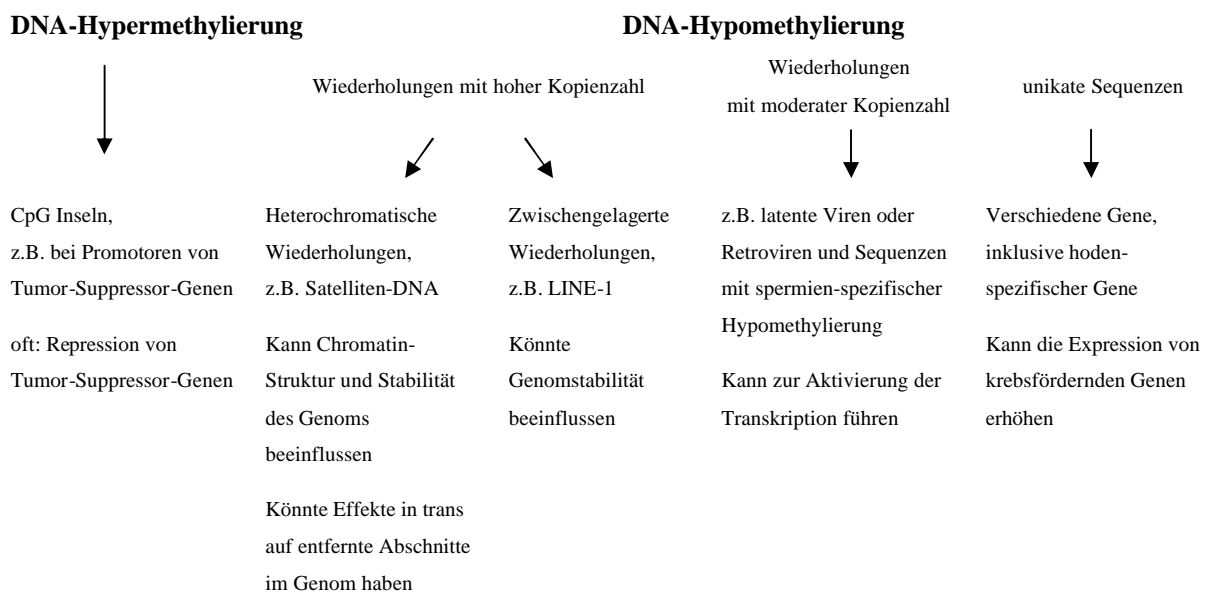


Abbildung 7. Zusammenfassung von Sequenzen, die häufig von krebsspezifischen DNA-Hyper- oder Hypomethylierungen betroffen sind. (Ins Deutsche übersetzt aus: Ehrlich, 2002).

Eine DNA-Hypomethylierung ist oft eher mit bösartigen als mit gutartigen Tumoren assoziiert (Ehrlich, 2002; Itano et al., 2002). DNA-Hyper- und Hypomethylierung sind zwei unabhängige Prozesse während der Tumorgenese (Kaneda et al., 2004a). Die Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Tumorarten können stark variieren. Auch innerhalb eines Tumortyps können in einem Tumor wichtige Genombereiche hyper- und hypomethyliert sein. Heute wird angenommen, dass sich de novo Methylierung und Demethylierung schrittweise während der Tumorgenese abwechseln können, so dass ein methylierter Promotor während des Wachstums eines Tumors auch wieder demethyliert werden kann (Cheng et al., 2001; Zhu et al., 2004). Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster scheinen dynamisch zu sein und unterliegen einer lang anhaltenden epigenetischen Instabilität.

A.10. Embryonalentwicklung

Während der Entwicklung von Säugetieren differenzieren totipotente Zellen zu Zelltypen und Geweben mit einem eigenen speziellen Programm der Genexpression. Diese unterschiedliche Expression von Genen wird durch epigenetische Prozesse wie DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen erreicht. Eine genomweite epigenetische Reprogrammierung findet immer dann statt, wenn sich das Entwicklungspotential einer Zelle ändert. Bei der Fertilisation befinden sich die parental Genome in verschiedenen Stadien des Zellzyklus und besitzen unterschiedliche epigenetische Merkmale. Nur das paternale Genom ist mit Hilfe von Protamin anstelle von Histonen verpackt, das maternale Genom ist außerdem in der Metaphase II der Meiose arretiert. Mit Beginn der Fertilisation werden die Protamine gegen Histone getauscht und das mütterliche Genom beendet die Meiose. Noch vor der ersten Replikation des väterlichen Genoms im Pronukleus wird dieses Genom aktiv demethyliert, während das mütterliche Genom erst nach dem Zweizellstadium durch einen replikationsabhängigen, passiven Mechanismus demethyliert wird (Abbildung 8 C und D, S. 13). Nach dem Achtzellstadium sind die paternalen und maternalen Chromosomen gleich stark methyliert (Abbildung 8 D; Mayer et al., 2000a). Die elterlichen Genome bleiben bis zum Zweizellstadium räumlich getrennt (Abbildung 8 A und B). Durch diese räumliche Trennung kann die Methylierung der Genome getrennt voneinander reprogrammiert werden (Mayer et al., 2000b; Haaf, 2001). Durch paternale Prägung methylierte Gene werden nicht demethyliert (Haaf, 2006) und nicht-methylierte Gene werden im Laufe der Embryogenese nicht de novo methyliert (Abbildung 8 D).

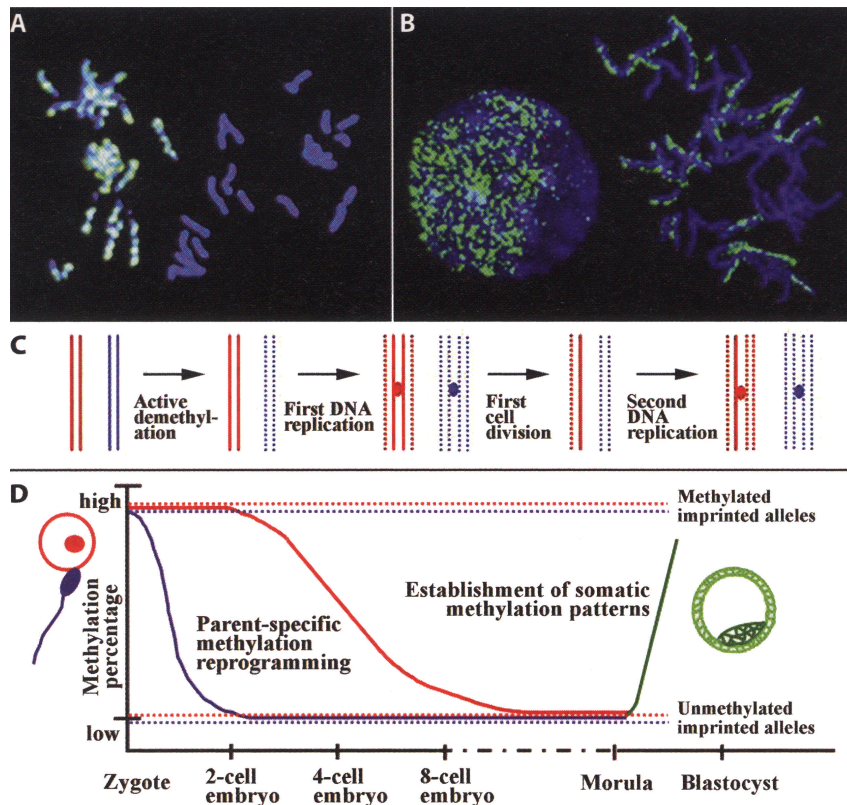


Abbildung 8. Elternspezifische Methylierung in frühen Embryonen von Mäusen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt und methylierte Cytosine mit FITC-konjugierten Anti-5-mC Antikörpern (grün) nachgewiesen. (A) Embryonen im Einzellstadium während der ersten Mitose. Die maternalen Chromosomen sind methyliert und strikt von den nicht-methylierten paternalen Chromosomen getrennt. (B) Embryonen im Zweizellstadium während der zweiten Mitose. Interphase-Kern: Räumliche Trennung von paternalen und maternalen Chromosomen. Metaphase Chromosomen: Nur ein Chromatid der maternalen Chromosomen verbleibt methyliert. (C) Aktive Demethylierung des paternalen Genoms (rot), Passive Demethylierung des maternalen Genoms (blau) durch einen replikationsabhängigen Mechanismus. (D) Methylierungsdynamik in frühen Embryos. Im Morulastadium sind die parentalen Genome gleichstark demethyliert und werden dann remethyliert. Die neu etablierten, somatischen Methylierungsmuster sind auf beiden Allelen gleich. Zellen, die von der inneren Zellmasse (hellgrün) abstammen sind stärker methyliert als Zellen der äußeren Zellschicht (dunkelgrün). Geprägte Gene (gepunktete Linien) entgehen den genomweiten Methylierungsänderungen und behalten ihre keimbahnspezifischen Methylierungsmuster. (Aus: Haaf, 2006).

Ein aktiv demethylierendes Enzym ist bis heute noch nicht eindeutig nachgewiesen worden. Während des Blastozystenstadiums werden in der inneren Zellmasse die somatischen Methylierungsmuster durch de novo Methylierung etabliert. Zellen der äußeren Zellmasse werden weniger stark methyliert (Abbildung 8 D). Durch die Reprogrammierung von Methylierungsmustern werden die inaktiven Gametengenome in Spermium und Ei reaktiviert, so dass sich während der somatischen Entwicklung Zellen differenzieren können.

A.11. Integration fremder DNA in Wirtsgenome

Fremde DNA kann in ein Wirtszellgenom integrieren. Diese Integration kann sich natürlich ereignen oder durch experimentelle Mechanismen, wie z.B. artifizielle Transfektionen oder somatischer Gentherapie, herbeigeführt werden. Viele DNA- und RNA-Viren sowie Bakteriophagen können ihr Genom in das Wirtsgenom der infizierten Zelle integrieren. Bakterien nutzen die DNA-Methylierung als Teil des Abwehrmechanismus gegen Bakteriophagen. Die Homologie zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Methyltransferasen (Bestor et al., 1988) ist ein Hinweis, dass DNA-Methylierung auch an der Inaktivierung von fremder oder invasiver DNA in Eukaryoten beteiligt sein könnte. Etwa 35% des humanen Genoms bestehen aus fremder DNA, Relikten mobiler Elemente wie Transposons oder endogenen Retroviren (Yoder et al., 1997b). Um die Ausbreitung dieser fremden DNA zu verhindern, scheinen Vertebraten und Pflanzen diese mobilen Elemente durch DNA-Methylierung zu inaktivieren. Auch Sequenzen die Transposons ähneln, und Elemente, die durch deren Aktivität entstehen, wie Sequenz-Wiederholungen, neu geschaffene DNA-Verbindungsstellen und Sequenz-Umlagerungen, sind häufig Ziele von DNA-Methylierungen (Wolffe und Matzke, 1999). Untersuchungen bei filamentösen Pilzen haben eine wichtige Rolle von duplizierten DNA-Sequenzen und der Interaktion dieser homologen Sequenzen bei der Verteidigung des Wirtszellgenoms gegen invasive DNA gezeigt. Die Prozesse RIP (engl.: **repeat-induced point mutation**, Wiederholungs-induzierte Punktmutation) in *Neurospora crassa* und MIP (engl.: **methylation induced premeiotically**, prämeiotisch induzierte Methylierung) in *Ascobolus immersus*, die zur Methylierung von duplizierten DNA-Sequenzen führen, sind auf diese Organismen beschränkt. Trotzdem können Homologien von DNA-Sequenzen eine wichtige Rolle bei der Wirtszellgenomverteidigung in höheren Organismen spielen.

Abbildung 9 (S. 15) zeigt mögliche Signale, die zur de novo Methylierung von fremden, invasiven Nukleinsäuren führen können. Bei der Integration adenoviraler DNA in das Wirtszellgenom von Ad12-transformierten und Ad12-induzierten Hamster-Tumor-Zellen konnten kurze Sequenzhomologien mit unterschiedlichen Längen von 2 bis 20 bp zwischen der Ad12-DNA und der Empfänger-DNA nachgewiesen werden (Gahlmann et al., 1982; Wronka et al., 2002). Freie adenovirale DNA konnte in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Ad12-DNA assoziiert mit den Chromosomen in abortiv und produktiv infizierten Zellen kurz nach der Infektion (Schroer et al., 1997). Der Mechanismus der Integration ähnelt der heterologen Rekombination, obwohl auch kurze Homologien zwischen den Rekombinationspartnern die Integration unterstützen können. Die zelluläre Insertionsstelle

von fremder DNA ist häufig transkriptionell aktiv (Schulz et al., 1987) und die Chromatin-Struktur offen (vorliegende Arbeit). Dies ist wahrscheinlich eine wichtige Voraussetzung für den Zugang der viralen DNA zum DNA-Doppelstrang des Wirtsgenoms ist. Die Insertionsstelle adenoviraler DNA scheint zufällig, ohne Präferenz für eine Sequenz oder ein Sequenzmotiv, zu sein (Doerfler et al., 1984). Neben der unmittelbaren Unterbrechung an der Insertionsstelle hat die Integration fremder DNA in ein Wirtszellgenom Auswirkungen auf das Methylierungsmuster und die Transkription in der Nähe der Insertionsstelle (cis) und in entfernten Regionen auf anderen Chromosomen (trans) (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999; Muller et al., 2001; Diplomarbeit N. Hochstein, 2003).

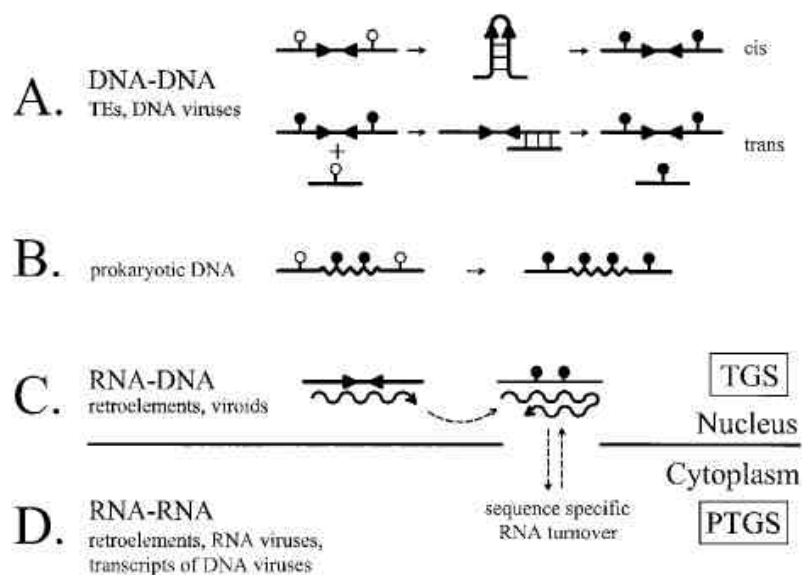


Abbildung 9. Mögliche Signale für eine de novo Methylierung von verschiedenen Transgenen. (A) Mehrere Kopien von Transgenen werden häufig als invertierte DNA-Wiederholungen angeordnet, die sich möglicherweise in cis paaren können (angedeutet durch die Leiter) und zur Methylierung führen können (gefüllte Kreise). Ein methylierter, repetitiver Locus kann möglicherweise durch ektopische DNA-Paarung (horizontale Leiter) Methylierungen in nicht verbundenen homologen Sequenzen in trans einführen. Mehrfache Kopien von integrierten transponierbaren Elementen (TEs) und DNA-Viren sind möglicherweise natürliche Ziele für Methylierungen durch DNA-DNA Interaktionen. (B) Prokaryotische Sequenzen (Zickzack-Linie), die in Pflanzengenome aufgenommen wurden, werden häufig, vielleicht wegen ihres hohen GC-Gehalts, methyliert. Diese Methylierung kann sich auf benachbarte Sequenzen ausbreiten (gerade Linie). (C) Doppelsträngige RNA (hier durch Transkription einer invertierten Wiederholung entstanden) kann zur Methylierung von nicht verbundenen homologen DNA-Sequenzen führen. Durch dsRNA hervorgerufene DNA-Methylierung kann an der transkriptionellen Genabschaltung (TGS, engl.: transcriptional gene silencing) von integrierten Retroelementen beteiligt sein und zur Pathogenität von Viroiden beitragen. (D) Doppelsträngige RNA, die von methylierten DNA-Vorlagen transkribiert wird, kann auch die posttranskriptionelle Genabschaltung (PTGS, engl.: post-transcriptional gene silencing) von homologen RNAs im Zytoplasma auslösen. (Aus: Matzke et al., 2000).

B. Zielsetzung der Arbeit

Etwa 45% des menschlichen Genoms bestehen aus repetitiven Elementen und integrierter fremder DNA, wie z.B. viralen Retrotransposons (Yoder et al., 1997b; Venter et al., 2001; Lander et al., 2001; Jordan et al., 2003). Die zelluläre Transkription und DNA-Methylierung wird durch Integration von fremder DNA beeinflusst (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999; Muller et al., 2001). Da Transgenome neben ihrem natürlichen Vorkommen im menschlichen Genom auch auf artifizielle Weise geschaffen werden, z.B. bei Knockin-/ Knockout-Experimenten oder gentherapeutischen Ansätzen, aber wenig über ihre Struktur und die Konsequenzen für die Empfänger-Zellen bekannt ist, wurden in dieser Arbeit in einem Modellsystem die Struktur, die Transkription und der epigenetische Zustand eines adenoviralen Transgenoms untersucht.

Die Ad12-transformierte Zelllinie T637 wurde durch Infektion der Hamsterzelllinie BHK21 (engl.: **b**aby **h**amster **k**idney **c**ells, Zelllinie aus Leberzellen eines neugeborenen Hamsters, Stoker und MacPherson, 1964) mit dem humanen Adenovirus Typ 12 (Ad12) erzeugt (Strohl et al., 1967). Die Genome der T637-Zellen tragen etwa 15 Kopien des Ad12-Genoms, die an einer einzigen chromosomalen Stelle integriert vorliegen (Stabel et al., 1980; Knoblauch et al., 1996; Schroer et al., 1997). Bei fortlaufender Kultivierung der Zelllinie T367 konnten spontan auftretende morphologische Revertanten isoliert werden, die eine intermediäre Zellstruktur zwischen der parentalen Zelllinie BHK21 (fibroblastisch) und der transformierten Zelllinie T637 (epitheloid) (Groneberg et al., 1978) zeigten. Diese revertanten Zellen haben unterschiedliche Anzahlen und Portionen der integrierten adenoviralen Kopien verloren. Die revertante Zelllinie TR12 beinhaltet noch eine komplette Ad12-Kopie und ein Fragment einer zweiten Kopie (Eick und Doerfler, 1982). In Ad12-transformierten Zelllinien und in Ad12-induzierten Hamster-Tumor-Zellen liegen die adenoviralen Genome chromosomal integriert und hypermethyliert vor (Groneberg et al., 1977; Sutter et al., 1978; Sutter und Doerfler, 1980; Orend et al., 1995). Ad12-DNA aus Viruspartikeln und freie intrazelluläre Ad12-DNA sind nicht methyliert (Gunthert et al., 1976; Kammer und Doerfler, 1995). Analysen der Methylierungszustände der Ad12-Transgenome in den Zelllinien T637 und TR12 durch methylierungssensitive Restriktionsenzyme haben gezeigt, dass die integrierte adenovirale DNA in den TR12-Zellen stärker methyliert ist als in den parentalen T637-Zellen (Orend et al., 1995). Bei der Entstehung der TR12-Zellen sind also die hypomethylierten integrierten

Ad12-Segmente verloren gegangen, während die hypermethylierten Ad12-Bereiche stabiler integriert sind.

Die Zelllinien T637 und TR12 ermöglichen eine Analyse von integrierter fremder DNA mit etwa 15 Ad12-Genomen im Vergleich zu einer einzigen Ad12-Kopie mit einem Fragment einer zweiten Kopie, die an der gleichen Stelle und zur selben Zeit ins Wirtsgenom aufgenommen wurde.

Das adenovirale Transgenom der Zelllinie TR12 beinhaltet 1634 CpG-Dinukleotide. Der Methylierungsstatus aller Cytosine wurde mit Hilfe des Bisulfit-Protokolls für genomische Sequenzierungen untersucht. Außerdem wurde das Methylierungsmuster zwischen der revertanten Zelllinie TR12 und der parentalen Zelllinie T637 in ausgewählten Ad12-Bereichen verglichen.

Die Transkriptionsraten von Ad12-Genen korrelieren häufig invers mit dem Grad der Methylierung in den Promotoren (Doerfler, 1981; Vardimon et al., 1982; Doerfler, 1983; Langner et al., 1984). Die Transkription der integrierten Ad12-Gene wurde in den T637- und TR12-Zellen mit quantitativen Methoden untersucht und mit dem Methylierungsstatus in den entsprechenden Promotorbereichen verglichen.

Der Einfluss des Integrationsereignisses auf die Organisation des Chromatins an der Insertionsstelle der adenoviralen Genome in den transformierten Zelllinien T637 und TR12 wurde im Vergleich zur ursprünglichen BHK21-Zelllinie analysiert. Zudem wurde untersucht, ob die Ad12-Transgenome die epigenetischen Prozesse und Organisationsformen der Wirtszelle übernommen haben.

C. Material

C.1. Chemikalien

2- Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
Agarose	Invitrogen, Paisley, UK
Ampicillin	Gerbu, Gailberg
Aprotinin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Bacto-Tryptone	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid	Chemetall, Frankfurt am Main
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Deoxycholsäure Natriumsalz	Fluka, Buchs, Schweiz
Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate	Promega, Madison, WI, USA
Dextransulfat	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS, ultrarein)	MP Biomedicals, Aurora, OH, USA
DTT (Dithiothreitol)	Merck, Darmstadt
EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Formaldehyd (37%)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Formamid	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glukose (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Glycerin, 99,5%	Baker, Deventer, Niederlande
Heringsspermien-DNA Typ XIV	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hepes	Sigma, St. Louis, MO, USA
Hydrochinon	Sigma, St. Louis, MO, USA
Igepal CA-630	Sigma, St. Louis, MO, USA

IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Lysolecithin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
MOPS (3-[N-morpholinol]-2-hydroxypropan-sulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumbisulfit	Sigma, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natrium-di-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs, Schweiz
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Phenol	Biomol, Hamburg
Phenolrot	Sigma, St. Louis, MO, USA
Pepstatin A	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protein A (1:1 Gemisch aus Agarose und Lachsspermien-DNA)	Upstate, Lake Placid, NY, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 25%, 37%	Merck, Darmstadt
Select-yeast-extract	Invitrogen, Paisley, UK
Sephadex G50	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Triton X-100	Sigma, St. Louis, MO, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, St. Louis, MO, USA
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)	Roth, Karlsruhe

C.2. Lösungen, Puffer, Medien

20× SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Na-Citrat
5× TBE	446 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	444 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA
5× MOPS-Puffer	0,2 M	MOPS, pH 7,0
	50 mM	Natriumacetat
	5 mM	EDTA, pH 8,0
Ampicillin Stammlösung	100 mg/ml	in ddH ₂ O
ChIP Verdünnungspuffer	0,01%	SDS
	1,1%	Triton X-100
	1,2 mM	EDTA, pH 8
	16,7 mM	Tris-HCl, pH 8.1
	167 mM	NaCl
ChIP Waschpuffer, wenig Salz	0,1%	SDS
	1%	Triton X-100
	2 mM	EDTA, pH 8
	20 mM	Tris-HCl, pH 8,1
	150 mM	NaCl
ChIP Waschpuffer, viel Salz	0,1%	SDS
	1%	Triton X-100
	2 mM	EDTA, pH 8
	20 mM	Tris-HCl, pH 8,1
	500 mM	NaCl
ChIP LiCl Waschpuffer	0,25 M	LiCl
	1%	IGEPAL-CA630
	1%	Deoxycholsäure Natriumsalz
	1 mM	EDTA, pH 8
	10 mM	Tris, pH 8,1

ChIP SDS Lysis Buffer	1%	SDS
	10 mM	EDTA, pH 8
	50 mM	Tris, pH 8,1
Chloroform-Isoamylalkoholgemisch	Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1	
Churchpuffer (pro Liter)	500 ml	0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,2
	2 ml	0,5 M EDTA, pH 8
	10 g	BSA
	70 g	SDS
Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate	10 mM in H ₂ O	
DNA-Ladepuffer	50%	Glycerin
	1%	SDS
	0,1 M	EDTA
	0,1%	Bromphenolblau (w/v)
	0,1%	Xylencyanol (w/v)
Einfriermedium für Eukaryontenzellen	10%	Glycerol
	10%	FCS
	in Dulbeccos's modifiziertem Eagle's Medium	
Ethidiumbromid-Lösung	2 µg/ml in ddH ₂ O	
Heringsspermien DNA	10 mg/ml in ddH ₂ O	
IPTG, 20%	20% IPTG in ddH ₂ O (w/v)	
LB-Medium (pro Liter)	10 g	NaCl
	10 g	Bacto-Tryptone
	5 g	Select-Yeast Extract
LB-Agar-Platten (pro Liter)	10 g	NaCl
	10 g	Bacto-Tryptone
	5 g	Select-Yeast Extract
	15 g	Agar
	100µg/ml	Ampicillin

Medium für Zellkultur	DMEM, engl.: Dulbeccos's modified Eagle's Medium (Invitrogen, Paisley, UK) 10% FKS (Cambrex, Verviers, Belgien) 100 U/ml Streptomycin (Invitrogen, Paisley, UK) 100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Paisley, UK)
Natrium-Phosphat-Puffer, 0,5 M, pH 7,2 (pro Liter)	~342 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ ~158 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 500 ml ddH ₂ O pH-Wert Einstellung durch Zugabe von 0,5 M Na ₂ HPO ₄ (alkalische Komponente) oder 0,5 M NaH ₂ PO ₄ (saure Komponente)
PBS-d, pH 7,4	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM NaH ₂ PO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄
RNase A Stammlösung	10 mg/ml in TE-Puffer
RNA-Ladepuffer	50% Glycerin 1 mM EDTA 0,4% Bromphenolblau (w/v)
RNA-Probenpuffer	10 ml deionisiertes Formamid 3,5 ml Formaldehyd (37%) 2 ml 5× MOPS-Puffer
SOB-Medium (pro Liter)	0,5 g NaCl 20 g Bacto-Tryptone 5 g Select-Yeast Extract
vor Gebrauch:	100 mM MgCl ₂ 100 mM MgSO ₄
SOC-Medium	fertiges SOB-Medium mit 20 mM Glukose
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

Tris-Saline	14 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	0,3 mM	Na ₂ HPO ₄
	25 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	0,1 %	Glukose (w/v)
Trypsin-EDTA-Lösung	0,12%	Trypsin (w/v)
	0,27 mM	EDTA
	0,0005%	Phenolrot (w/v)
Waschpuffer Southern Blot, geringe Stringenz	2×	SSC
	0,1%	SDS
mittlere Stringenz	1×	SSC
	0,1%	SDS
hohe Stringenz	0,1×	SSC
	0,1%	SDS
X-Gal, 2%	2%	X-Gal in DMF (w/v)

C.3. Radioisotop

Desoxycytosin-5'-[α -³²P]-triphosphat, Amersham Biosciences, Piscataway, USA
spezifische Aktivität >3000 Ci/mmol

C.4. Plasmide

pBS(+)-Klonierungsvektor Stratagene, La Jolla, CA, USA
pGEM-T-Klonierungsvektor Promega, Madison, WI, USA

C.5. PCR-Primer

<i>Experiment</i>	Genbereich	Position im Ad12-Genom		Sequenz 5' → 3'	
<i>Micrococcus- Nuklease</i>	MLP	5303	5897	v GGG CGT ACA GTT TTG GAG C	r GAA ACT GAC ACG TTG AGT ACA GA
	E4	33726	34125	v CCC AGG TCC CGT AAA ATA CA	r CCT ATC TAA TAA TAT ACC TTA TAC TGG AC
<i>ChIP (qPCR)</i>	E1A	199	271	v TGG GCG TTG TTT GTG CAA	r TGC CGT CAT CAA TTT TCA CTT C
	E1B	1508	1634	v GGG TTG GTG TTG CTT TGA ATA GTT	r CAG ATA CCT CCA AAA ACC T
	E4	33881	33953	v CAC AAC ACA AAA AAA ACC CCA AA	r AAC ACC GTA TTA TGC CGA GTC AT
	MLP	5554	5631	v CCG CGG TCC TCC TCG TA	r TGT GGC TTC CTT TGT ACT TGC TT
	[beta-Aktin]			v GCC CTG GAC TTC GAG CAA	r TCA GGC AGC TCA TAG CTC TTC TC
	Transkription (qPCR)	E1A	677	750	v CAG GCG GTG AAT GAG TTT TTT C
	E1A (Standard)	649	809	v GGA GTC TGC CGG TGA AGA TAA TAA	r CAG GGT GCA GTT GTG GCA TA
	E1B	2045	2121	v CAG GTG CAA GAA GGC CAT GT	r TTT TTT TCC TGC TTA TCT CTA TCA TCT G
	E1B (Standard)	2016	2177	v GCG GTG GTG GAG AAG TAA ACA	r GGG ACA TCA GAT TAA CAG TTA GCC TAC TA
	E4	32627	32711	v CAG CAA GGA TTT GAA TGC GTA A	r CAA TTT GAT CTG GCT GTG ATC TTT
	E4 (Standard)	32585	32755	v GAG GAA TAC AAG GTA GAG GCA TAA AAA C	r TGG CTC TTT TAG AAG CTG TTG TTG
	Hexon	19553	19630	v CCA ACG ACC AGT CTT TTA ACG AT	r GCA CGC TGG TGG CGT TAG
	Hexon (Standard)	19492	19664	v AAC TTT TTT CCC ATG GCA CAT AA	r AAT GCC GCC CAA TTT CG
	Penton	14141	14217	v GGT ATA AGA AAG AGG CAG CCG TTT	r GCT GGA ATA TTG CCT CCC TCT A
	Penton (Standard)	14109	14259	v ATT TTA CAG AGA GCA GAT TAA GCA ACA T	r TGA TCC TGC AGA CTG TTT TCG T

Protease	20628	20689	v	GCG ACC GCT TAT CAT GTG CTA
			r	CCA GTG TAC GCC CCC AGT T
Protease	20584	20735	v	TTT TTT GGG AAC CTT TGA CAA AC
(Standard)			r	CGA ATA AAT AGC AAG TGT GCG ATT
Sequenzierung	[Sp6]			GAT TTA GGT GAC ACT ATA G
	[T7]			TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Primerpaare für die Methylierungsmusteranalyse sind im Anhang (S. 108) aufgeführt.

C.6. Antikörper

Anti-acetyl-Histon H3	Upstate, Lake Placid, NY, USA
Anti-acetyl-Histon H4	Upstate, Lake Placid, NY, USA
Anti-trimethyl-Histon H3 (Lys 9)	Upstate, Lake Placid, NY, USA
Anti-trimethyl-Histon H4 (Lys 20)	Upstate, Lake Placid, NY, USA

C.7. Zelllinien

HeLa (menschliche Zellen eines Cervix-Karzinoms)

American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA, Nr.: CCL 2

BHK21 (Fibroblasten neugeborener Hamster)

American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA, Nr.: CCL 10

T637 (Ad12-transformierte BHK21-Zellen)

Strohl et al., 1967

TR12 (Revertante der Zelllinie T637)

Groneberg et al., 1978

C.8. Bakterienstamm

XL1-Blue, subcloning-grade Stratagene, La Jolla, CA, USA

C.9. DNA-Größenmarker

Gene Ruler DNA Ladder Mix	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen
Lambda DNA/Eco130I (StyI) Marker, 16	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen

C.10. Enzyme**C.10.1. Restriktionsendonukleasen**

Alle Restriktionsenzyme (MBI-Fermentas, Wilna, Litauen) wurden mit den empfohlenen 10× Puffern verwendet.

C.10.2. sonstige Enzyme

DNase I, RNase-frei	Promega, Madison, WI, USA
Lysozym	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Micrococcus-Nuklease	MBI-Fermentas, Wilna, Litauen
Proteinase K	Sigma, St. Louis, MO, USA
RNase A	Sigma, St. Louis, MO, USA
T4 DNA-Ligase	Promega, Madison, WI, USA
Taq DNA-Polymerase	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Gerbu, Gailberg
Reverse Transkriptase (SuperScript III)	Invitrogen, Paisley, UK

C.11. Laborgeräte

Bakterienbrutschrank	Memmert, Schwabach
Bakterieninkubationsschüttler Multitron 2	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
DNA-Sequenziermaschine,	
ABI Prism 377 DNA Sequencer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Entwicklermaschine X-OMAT M35	Kodak, Rochester, NY, USA
Fluoreszenzmikroskop, LSM4	Carl Zeiss, Jena

Gel-Dokumentationssystem

Herolab E.A.S.Y. RH	Heraeus, Düsseldorf
Gelkammern,	Roth, Karlsruhe
HU6, HU10, DNA-Pocketblock	Biozym, Oldenburg
Neubauer Zellzählkammer	Brand, Wertheim
Magnetrührer	Janke und Kunkel, Staufen
Membranpumpe	Vakuubrand, Wertheim
Netzgerät GPS 200/400	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
PCR Maschine, Geneamp PCR-System 9600	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten, 1-20, 10-200, 100-1000 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand, Wertheim
Radiomembran-detektor BAS 2000	Fuji, Tokio, Japan
Rollinkubator APT Line	Biometra, Goettingen
Sterilbank, Antair BSK 4	Anthos Mikrosysteme, Köln
Szintillationszähler	
Wallac1450 Microbeta Trilux	PerkinElmer, Wellesley, MA, USA
Taumel-Schüttler 3011	GFL, Burgwedel
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühltruhe (-80°C) Hera Freeze	Heraeus, Düsseldorf
Überkopffrotator 3025	GFL, Burgwedel
Vortex Genie 2	Bender&Holbein, Zürich, Schweiz
Wärmeblock, Driblock 08-3	Techne, Duxford, Cambridge, England
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserfilteranlage Super Q	Millipore, Bedford, MA, USA
Zellkulturinkubator Steri-Cult 200	Forma Scientific, Marietta, OH, USA
Zellzählgerät	
Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer	Beckman/Coulter, Fullerton, CA, USA
Zentrifuge Biofuge Pico (Tischzentrifuge)	Heraeus, Düsseldorf
Zentrifuge L7-55 (Ultrazentrifuge)	Beckman/Coulter, Fullerton, CA, USA
Zentrifuge Sigma 4K10 (Laborzentrifuge)	B. Braun, Melsungen

C.12. Labormaterialien

Blaukappröhrchen, 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Cryogefäße, Cryo.S 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Dialyseschläuche	Medicell, London, UK
Einwegkanülen	Terumo, Leuven, Belgien
Einwegspritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Filterpapier MN 827 B	Macherey-Nagel, Düren
Frischhaltefolie	Melitta, München
Gefäße, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Glaswaren	Schott, Mainz
	Brand, Wertheim
Hybridisierungsröhren	Bachofer, Reutlingen
Nylonmembran Hybond-XL	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Objektträger "Super Frost"	Roth, Karlsruhe
Parafilm „M“	American Can Comp., Greenwich, CT, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Phosphoimager Abbildplatten BAS-III	Fuji, Tokio, Japan
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, mit Filter	Peqlab, Erlangen
Quarzglasküvette, 50 µl	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA
Reaktionsgefäße, 0,2-, 0,5-, 1,5-, 2 ml	Biozym, Oldenburg
	Eppendorf, Hamburg
	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme X-OMAT AR5	Kodak, Rochester, NY, USA
Röntgenfilmkassetten	Dr. Goos, Heidelberg
Zellkulturflaschen, 25-, 75-, 175 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 96-, 24-, 6-Loch	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen, 10 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Corning, NY, USA

C.13. Kits und Reagiersysteme

2× PCR Mastermix	AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
2× PCR Mastermix (qPCR)	QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Hilden
Gelaufreinigung	Perfectprep Gel Cleanup, Eppendorf, Hamburg
Klonierung von PCR-Fragmenten	pGEM-T, Promega, Madison, WI, USA
Nick Translation	HighPrime, Roche, Mannheim
Plasmid-DNA Isolation	FastPlasmid, Eppendorf, Hamburg
RNA-Isolation	RNeasy Midi mit „on column“ DNase set, Qiagen, Hilden

D. Methoden

D.1. Zellkultur

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinien HeLa, BHK21, T637 und TR12 erfolgte nach Standardmethoden bei 37°C, 80% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Atmosphäre in Dulbeccos Modified Eagle's Medium (Invitrogen, Paisley, UK) mit 10% FKS (Cambrex, Verviers, Belgien). Bei einer Passage von 1:6 bis 1:8 (HeLa), 1:60 (BHK21) bzw. 1:40 (T637, TR12) wurde die Vollkonfluenz in der Regel nach drei Tagen erreicht.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer oder ein Beckman/Coulter Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer Zellzählgerät verwendet.

D.2. Virusproduktion

D.2.1. Inokulation von Zellen mit Viren

Zur Produktion von Adenovirus Typ 12 Virionen wurden HeLa-Zellen (in Zellkulturschalen) bei einer Konfluenz von ~50% mit einer *moi* ~100 (Multiplizität der Infektion, engl.: **m**ultiplicity **o**f **i**nfection = Pfu pro Zelle; Pfu = engl.: **p**laque **f**orming **u**nits, infektiöse Partikel) wie folgt inokuliert: Das Zellkulturmedium wurde vollständig entfernt, und etwa 1 ml frisches Medium mit 10% durch Hitze inaktiviertem FKS wieder zugegeben. Nach Zugabe des Virusinokulums wurden die Zellen 2 h im Zellinkubator gehalten und alle 30 min geschwenkt. Anschließend wurde das Inokulum vollständig entfernt, 10 ml frisches Medium zugegeben und die Zellen für 72 bis 96 h bei 37°C inkubiert.

Wenn die meisten Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten, wurden die Zellen von der Plastikschale mit einem Zellschaber abgelöst und in einen Zentrifugenbecher auf Eis überführt. Nach Sedimentation für 15 min bei 500 g und 4°C wurde der Überstand vorsichtig verworfen, und die Zellen in 3 ml Tris-Saline resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese bei 4°C in einem Branson 450 Bechersonifikator sechsmal 20 s lang (mit jeweils 20 s Pause) Ultraschall-behandelt. Der vollständige Aufschluss der Zellen wurde im Lichtmikroskop kontrolliert. Zelltrümmer wurden 5 min lang bei 5300 g und 4°C sedimentiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde bei -20°C gelagert oder direkt zur Virusreinigung verwendet.

D.2.2. Virusreinigung

Zur Reinigung der Virionen wurde Rohextrakt mit 0,5 g Cäsiumchlorid pro ml versetzt und in einem SW60-Rotor bei 40000 rpm und 4°C min. 16 h lang bis zum Equilibrium (Schwebedichte Ad12: 1,3415) ultrazentrifugiert. Die Virusbande wurde ausgetropft oder durch Punktion des Zentrifugenröhrchens mit einer Spritze abgesaugt. Virionen wurden bei 4°C gelagert. Durch Restriktionsanalyse der viralen DNA wurde überprüft, ob es sich um Ad12-Virus handelt. Zur Isolation viraler DNA wurde die Virusreinigung zweimal wiederholt und die Virussuspension gegen TE-Puffer dialysiert.

D.2.3. Bestimmung von Viruskonzentrationen

Die Konzentration einer frischen Viruslösung kann photometrisch nach folgender Formel bestimmt werden (Burlingham und Doerfler, 1971):

$$OD_{260nm} \cdot 1 \stackrel{\Delta}{=} 2 \times 10^{10} \text{ Pfu/ml}$$

D.3. DNA-Präparation

Die Extraktion genomischer DNA aus kultivierten Zellen oder viraler DNA aus Virionen erfolgte nach etablierten Protokollen mit SDS-Aufschluss, Proteinase-K-Behandlung, Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation.

D.4. Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

(Kaiser und Hogness, 1960)

Zur Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen wurde ein Eppendorf BioPhotometer benutzt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger DNA und RNA.

D.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1985)

PCRs (Polymerase-Kettenreaktionen, engl.: **p**olymerase **c**hain **r**eactions) wurden mit *Taq* DNA-Polymerase durchgeführt. Oligonukleotid-Primer wurden von Sigma, St. Louis, MO, USA hergestellt. Standard PCRs wurden in 25 µl Reaktionsvolumen mit 0,1-1 ng Plasmid-DNA, 10 ng adenoviraler DNA oder 500 ng genomischer DNA und 1× PCR-Puffer,

1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 1 U *Taq* DNA-Polymerase, 0,2 μM je Primer mit folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 95°C initiale Denaturierung (2 min), 25-35 Zyklen mit 95°C (30 s), primerabhängige Anlagerungstemperatur (30 s), 72°C (45 s) und finaler Extension bei 72°C (7 min).

D.6. Klonierungen

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden PCRs im Agarosegel aufgetrennt, das PCR-Produkt ausgeschnitten, gereinigt (Perfectprep Gel Cleanup Kit, Eppendorf, Hamburg) und nach Angaben des Herstellers (Promega, Madison, WI, USA) in den T-Überhang-Vektor pGEM-T kloniert. Die Transformation kompetenter XL1-blue E.coli Bakterien erfolgte nach Hanahan, 1983. Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde das FastPlamid Mini Kit (Eppendorf, Hamburg) benutzt.

D.7. DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten durch Mitarbeiter im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) auf einem ABI Prism 377 DNA Sequenzier Gerät der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) mit der Taq FS BigDye-Terminator Zyklus Sequenziermethode nach Sanger et al., 1977. Die Rohdaten wurden mit dem Programm Chromas (Technelysium Pty. Ltd., Helensvale, Australien) ausgewertet.

D.8. Southern-Transfer-Analysen

Southern-Transfer und DNA-DNA-Hybridisierungen wurden nach Standardmethoden (Southern, 1975; Koetsier et al., 1993) wie folgt durchgeführt: Nach Denaturierung der DNA im Agarosegel durch Inkubation in frisch angesetzter 0,4 N NaOH-Lösung 20 min lang, wurde der Transfer-Blot wie folgt von unten nach oben aufgebaut: Ein Stapel von ca. 15 cm Saugpapier – zwei Lagen Whatman Filterpapier – positiv geladene Nylonmembran (Hybond XL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), zuvor 1 min in 1× SSC präinkubiert – Agarosegel – zwei Lagen Whatman Filterpapier – Brücke aus zwei Lagen Whatman Filterpapier zu den Laufpufferreservoirs (0,4 N NaOH). Nach dem Transfer ü.N., min. 14 h lang, wurde die Membran 1 h lang bei 80°C gebacken.

Zur Prähybridisierung wurde die Membran kurz in 2× SSC angefeuchtet, in eine Hybridisierungsröhre überführt und 4 bis 8 h lang bei 65°C mit 10 ml vorgewärmten

Churchpuffer im Rollinkubator inkubiert. Die [α - 32 P]-dCTP-markierten DNA-Sonden wurden nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) durch Nick Translation mit dem High Prime Kit hergestellt. Die Sonden wurden nach Herstellerprotokoll über Sephadex G50 Quick Spin Säulchen (Roche, Mannheim) gereinigt. Die Aktivitäten der radioaktiven Sonden lagen routinemäßig bei $2\text{-}8 \times 10^7$ cpm (engl.: **counts per minute**). Zur Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer aus der Röhre entfernt und die denaturierte Sonde (5 min im kochenden Wasserbad, anschließend 2 min auf Eis) in 10 ml vorgewärmten Churchpuffer zugegeben. Die Inkubation erfolgte ü.N., min. 16 h lang, bei 65°C im Rollinkubator.

Die Membran wurde, ebenfalls im Rollinkubator bei 65°C, nach folgendem Schema mit jeweils ~100 ml der Waschlösungen gewaschen: Waschlösung 1 einmal kurz, zweimal 5 min - Waschlösung 2 zweimal 5 min – Waschlösung 3 zweimal 8 min. Anschließend wurde die Membran noch feucht in Frischhaltefolie verpackt. Die Visualisierung erfolgte über Autoradiographie mit Phosphoimager Platten oder Röntgenfilmen.

D.9. RNA-Präparation

Gesamtzelluläre RNA wurde aus exponentiell wachsenden T637- und TR12-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 70% mit Qiagens RNeasy Midi Säulensystem nach Protokoll des Herstellers isoliert. Genomische DNA wurde zweimal in den RNA-Proben verdaut: während der Aufreinigung mit Qiagens „on column“ DNaseI set direkt auf der Säule und nach Präparation der RNA-Proben mit Promegas RQ1 DNase, jeweils nach Angaben des Herstellers. Die gesamtzelluläre RNA wurde Ethanol-präzipitiert, in 30 μ l RNase-freiem Wasser resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert (Langzeitlagerung bei -80°C).

Eine Degradierung von RNA-Proben wurde mit einer Auftrennung der RNA-Proben in einem Agarosegel überprüft. Dazu wurde etwa 1 μ g der RNA-Probe in 10 μ l RNA-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 68°C denaturiert. Versetzt mit 1/10 Volumen RNA-Ladepuffer wurde die RNA-Probe in einem 1%igen Agarosegel (0,5 \times TBE) aufgetrennt. Bei nicht degradiertem RNA lassen sich die ribosomalen 28 S-, 18 S- und 5 S-RNA-Spezies als diskrete Banden erkennen. Die in ihrer Größe variierenden mRNA-Moleküle werden zwischen diesen Banden sichtbar.

D.10. cDNA-Synthese

Gesamtzelluläre RNA wurde mit zufälligen Oligonukleotid-Hexameren (engl.: random hexamers) oder mit genspezifischen Primern wie folgt revers transkribiert: 2 µg gesamtzelluläre RNA wurden mit 200 Units Reverser Transkriptase (Superscript III, Invitrogen, Paisley, UK) und 250 ng random hexamers bzw. 2 pmol genspezifischer Primer nach Angaben des Herstellers 60 min lang bei 50°C (random hexamers) bzw. 55°C (genspezifische Primer) in cDNA umgeschrieben.

Die Transkription adenoviraler Gene verläuft in großen Teilen des Ad12-Genoms bidirektional. Bei mit random hexamers hergestellter cDNA amplifizieren PCR-Primer in diesen Bereichen mRNA der beiden komplementären DNA-Stränge, so dass für die adenoviralen Gene Hexon, Penton und Endoprotease genspezifische Primer zur cDNA-Synthese verwendet wurden. Für die Ad12-Gene E1A, E1B, E4, Fiber und das zelluläre beta-Aktin-Gen sind Regionen bekannt an denen die Transkription unidirektional verläuft, was in diesen Fällen die Spezifität der PCR-Primer für die gesuchten Gene garantiert.

D.11. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Mit der qPCR-Methode lässt sich die Anzahl an cDNA- oder DNA-Molekülen in einer Probe bestimmen oder das relative Verhältnis an Matrizenmolekülen in mehreren Proben angeben. In vorliegender Arbeit wurde diese Methode genutzt, um (i) die Transkription von adenoviralen Genen in den Zelllinien T637 und TR12 zu untersuchen und (ii) die Menge an Antikörper-präzipitiertem Chromatin zu bestimmen (ChIP-Methode siehe S. 39). In beiden Fällen wurde zur Detektion des qPCR-Amplikons der Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green in doppelsträngige DNA genutzt. Bei qPCR-Analysen wird die Fluoreszenzintensität nach jedem PCR-Zyklus bestimmt, so dass PCRs mit gleicher Effizienz in ihrer exponentiellen Phase verglichen werden können. Nur in der exponentiellen Phase einer idealen PCR mit einer Effizienz von 100% wird in jedem Zyklus die Anzahl der Amplikonmoleküle verdoppelt, da während der frühen exponentiellen Phase alle PCR-Komponenten im Überschuss vorliegen, so dass die PCR-Produkte nicht um die Primer oder dNTP's kompetieren müssen. Außerdem nimmt auch die Effizienz der DNA-Polymerase während der späten exponentiellen Phase und der Plateauphase ab.

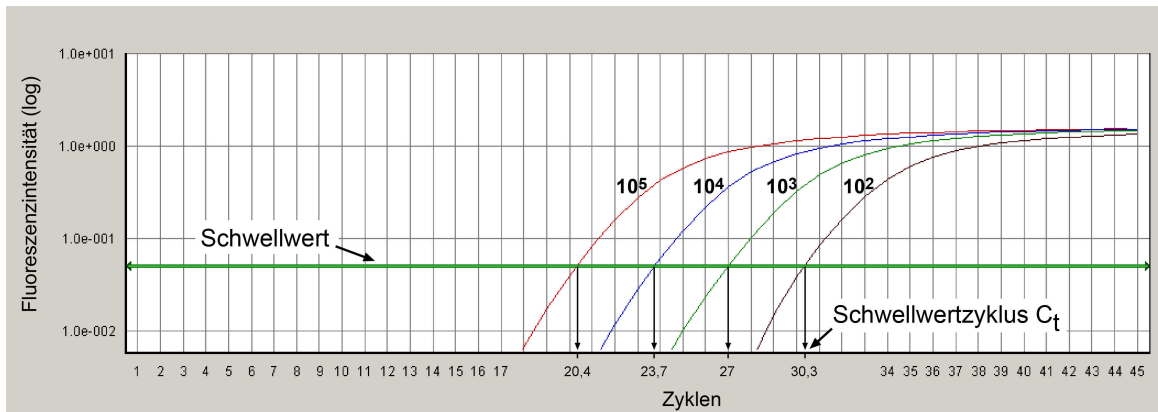


Abbildung 10. Bestimmung des Schwellwertzyklus C_t bei qPCRs. Dargestellt sind vier Reaktionen mit bekannter Anzahl an Matrizenmolekülen (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5). Die Fluoreszenz wird bei jedem qPCR-Zyklus für jede Reaktion gemessen und gegen die Zyklusnummer aufgetragen. Die Ordinatennachse gibt die Intensität der Fluoreszenz in logarithmischer Auftragung an, die Abszisse die Zyklen. Die Zyklen bei dem der Schwellwert (grüne Linie) die Kurven schneidet wird als Schwellwertzyklus C_t bezeichnet.

Zum Vergleich mehrerer PCRs dient der Schwellwertzyklus C_t . Durch den Vergleich der C_t s von unbekanntem Proben mit Proben mit bekannter Matrizenzahl lässt sich die Anzahl der Ausgangsmoleküle quantitativ in den unbekanntem Proben bestimmen. Beim Vergleich zweier unbekannter Proben kann nur ein relativer Wert angegeben werden. Standardproben mit bekannter Anzahl an Matrizenmolekülen wurden in vorliegender Arbeit mit Hilfe von PCR-Produkten erstellt, die ein wenig länger waren als die qPCR-Produkte. Abbildung 11 zeigt ein Beispiel für eine Standardkurve.

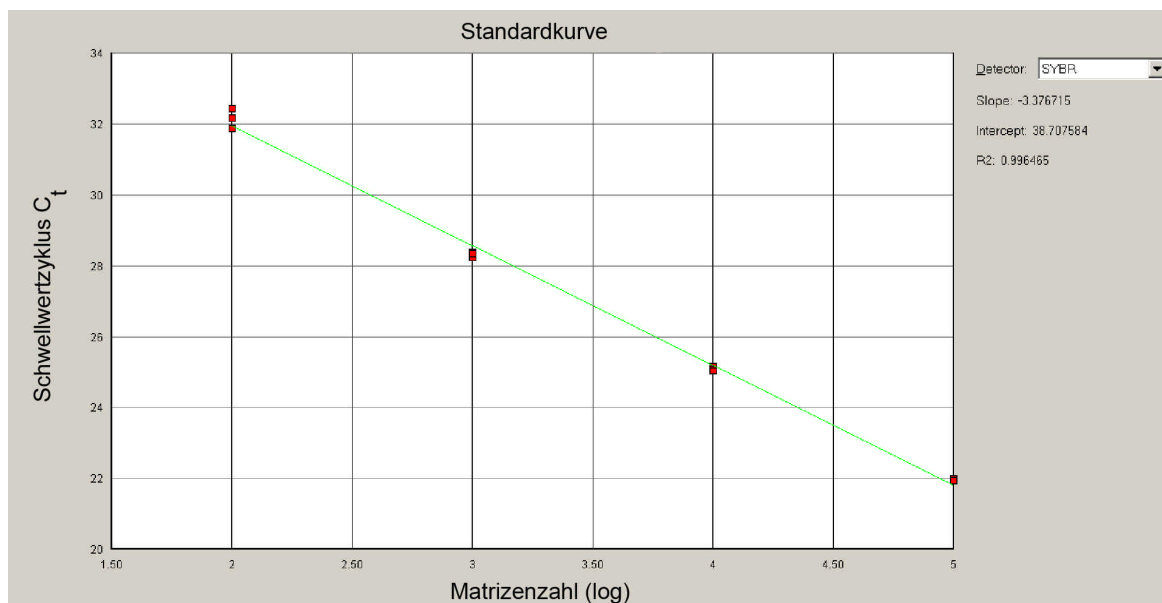


Abbildung 11. Standardkurve einer qPCR. Die Schwellwertzyklen von vier Standardproben mit jeweils 3-facher Ausführung wurden gegen die bekannte Anzahl an Ausgangsmolekülen aufgetragen und durch eine Gerade verbunden. Die Werte für Slope (deutsch: Steigung), Intercept (deutsch: Schnittpunkt) und R^2 geben Hinweise auf die Effizienz und Empfindlichkeit der qPCR (siehe Text).

Vier Standardproben enthielten 10^5 , 10^4 , 10^3 oder 10^2 Matrizenmoleküle. Das Auswerteprogramm des benutzten qPCR-Systems mittelt die Werte aus den jeweils 3-fach angesetzten Standards, trägt die C_t s der Proben gegen die logarithmische Anzahl der Ausgangsmoleküle auf und verbindet die Werte zu einer Geraden. Die Steigung (engl.: slope) einer idealen qPCR beträgt -3,32, da sich die Amplifikate während einer PCR mit einer Effizienz von 100% alle 3,32 Zyklen verzehnfachen müssten. Eine gute Reaktion sollte eine Effizienz zwischen 90% und 110% besitzen, was einer Steigung von -3,58 bis -3,10 entspricht. Der Intercept-Wert (Schnittpunkt = engl.: intercept point) gibt den Zyklus an bei dem die Gerade die y-Achse schneidet. Bei einer idealen PCR sind ungefähr 38 Zyklen notwendig, um aus einem einzelnen Matrizenmolekül eine messbare Zahl von Kopien zu produzieren. Der R^2 -Wert gibt einen Hinweis auf die Lage der einzelnen Datenpunkte im Verhältnis zu Gerade und wird durch zahlreiche Faktoren, wie z.B. Genauigkeit der Verdünnungen und Pipettierschritte, Kontaminationen oder nicht-spezifische Fluoreszenzdetektion, beeinflusst.

qPCRs wurden mit 2× Mastermixen von AppliedBiosystems bzw. Qiagen in einem Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System Gerät durchgeführt. Die Spezifität des SYBR-Green-Einbaus in das gesuchte qPCR-Amplikon wurde durch eine Dissoziationsanalyse der Amplifikate, Überprüfung der Amplikongröße im Agarosegel und die Verwendung von Wasserkontrollen sichergestellt.

Die zur cDNA-Synthese eingesetzten RNA-Proben wurden zweimal mit DNaseI behandelt, um Verunreinigungen der RNA-Präparationen mit genomischer DNA zu verhindern. Verbleibende genomische DNA könnte in der qPCR als Matrize erkannt und vervielfältigt werden. Zur Kontrolle, dass die RNA-Proben frei von genomischer DNA waren, wurden Schein-cDNA-Synthesen ohne Zugabe der Reversen Transkriptase durchgeführt ((-)RT-Kontrollen).

Die Transkriptionsraten von adenoviralen Genen wurden durch absolute Quantifizierung bestimmt und in Prozent der Transkriptionsrate des internen Kontrollgens (beta-Aktin) angegeben. Für die qPCRs wurde jeweils cDNA eingesetzt, die aus 0,1 ng (beta-Aktin) bzw. 10 oder 100 ng (alle anderen Gene) gesamtzellulärer RNA hergestellt worden waren. Jede Reaktion wurde mindestens doppelt durchgeführt.

Die Präzipitationsrate von den untersuchten Chromatinabschnitten mit Antikörpern gegen modifizierte Histone wurde relativ zum eingesetzten Chromatin angegeben.

D.12. Bestimmung von DNA-Methylierungsmustern

D.12.1. Bisulfit-Konversion genomischer DNA zur Analyse von Methylierungsmustern

Nur etwa jedes zehnte CpG-Dinukleotid liegt in der Erkennungssequenz von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen. Frommer et al. beschrieben 1992 eine Methode zur Identifizierung von allen 5-Methyl-Cytosinen in einer Sequenz. Abbildung 1 (S. 2) zeigt die chemische Reaktion von Cytosin-Resten mit Bisulfit (Clark et al., 1994). Unter den gewählten Reaktionsbedingungen werden alle Cytosine zu Uracilen konvertiert, während 5-Methyl-Cytosine unreaktiv bleiben. Die Bisulfit-behandelte DNA wird über PCR amplifiziert, in einen Vektor kloniert und sequenziert. Alle nichtmethylierten Cytosine erscheinen im Vergleich zur unbehandelten DNA als Thyminde, alle methylierten Cytosine bleiben Cytosine, so dass eine Identifizierung von 5-Methyl-Cytosinen möglich wird.

D.12.2. Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit

Genomische DNA wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aus T637- oder TR12-Zellen isoliert, drei Tage gegen TE-Puffer dialysiert und Ethanol präzipitiert. Die genomische DNA wurde durch zehnmaliges Auf- und Abziehen durch eine Injektionsnadel (Größe 23) geschert. In einer Konversionsreaktion wurden 2 µg genomische DNA wie folgt behandelt: 50 µl der DNA-Lösung wurden mit 3 N NaOH (Endkonzentration 0,3 N) 15 min lang bei 37°C und 2 min lang im kochenden Wasserbad vollständig denaturiert und schnell ca. 2 min lang auf Eis gekühlt. Die Bisulfit-Lösung (8,5 g Natrium Bisulfit, 20 ml ddH₂O, 2,25 mM Hydroquinone, pH 5, Einstellung mit 5 N NaOH) wurde immer frisch mit entgastem ddH₂O angesetzt. 500 µl der Bisulfit-Lösung wurden mit der denaturierten DNA gemischt, mit N₂-Gas überschichtet, und 17 h lang bei 50°C im Dunkeln inkubiert. Die Reinigung und alkalische Desulphonierung erfolgte in Microcon YM-100 Säulchen (Boyd und Zon, 2004) wie folgt: Alle Zentrifugationsschritte wurden solange wie angegeben in einer Tischzentrifuge bei 500 ×g durchgeführt oder bis noch ca. 50 µl der Lösung in der Säule verblieben waren.

1. Transfer der Bisulfit-Lösung in die Säulchen
2. Zentrifugation, 8 min
3. Durchfluß verwerfen, Zugabe von 350 µl Wasser, 6 min Zentrifugation
4. Wiederholung von Schritt 3
5. Alkalische Desulphonierung: Zugabe von 3 N NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,3 N und Inkubation für 20 min bei 37°C, 6 min Zentrifugation
6. Durchfluß verwerfen, Zugabe von 350 µl Wasser, 6 min Zentrifugation

7. Zugabe von 50 µl TE Puffer, mischen und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur
8. Elution: Invertieren des Säulchen in ein frisches Auffanggefäß, Zentrifugation, 8 min, 1000 g

1-2 µl des Eluats waren üblicherweise ausreichend für eine PCR.

Für einige Kontrollreaktionen wurde das MethylEasy Kit (Human Genetic Signatures, Sydney, Australien) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Grundlage dieses Reagiersystems ist auch die Reaktion von nicht methylierten Cytosin-Resten mit Bisulfit zu Uracil-Resten.

D.12.3. Polymerase-Kettenreaktion Bisulfit-behandelter DNA

Zur Bestimmung aller 1634 CpG-Dinukleotide im adenoviralen Integrat von TR12 Zellen wurde das 38 kbp große Transgenom in 81 PCR-Fragmente unterteilt. PCR-Primer wurden mit Hilfe des Programms MethPrimer entworfen (Li and Dahiya, 2002). Um die Spezifität und Ausbeute der PCR zu erhöhen wurden für jedes Fragment zwei Primerpaare verwendet, wobei das zweite Primerpaar im Amplikon des ersten Primerpaares liegt (verschachtelte PCR, engl.: nested PCR).

Die erste Reaktion einer verschachtelten PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit 1-2 µl Bisulfit-behandelter DNA, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP's, 1,25 Units Taq (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,2 µM Primern oder mit 2x AmpliTaq Gold PCR Mastermix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in einem Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400 mit folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: 95°C initiale Denaturierung (5 min), 25-45 Zyklen mit jeweils 95°C (1 min), 50°C (2 min), 72°C (2 min), letzter Verlängerungsschritt bei 72°C (10 min). Die verschachtelte PCR wurde unter gleichen Bedingungen mit 1/10 des Reaktionsvolumens der ersten PCR durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel auf ihre Größe überprüft, ausgeschnitten und gereinigt. Nach Angaben des Herstellers wurden die gereinigten PCR-Fragmente in den T-Überhang-Vektor pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) kloniert.

400 ng Plasmid DNA wurden für eine Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Sequenzierungen (siehe S. 32) wurden mit einem ABI Prism 377 DNA Sequenzierer mit der Taq FS BigDye-Terminator Zyklus Sequenziermethode durchgeführt.

D.12.4. Bestimmung von 5-Methyl-Cytosinen

Im Vergleich zur originalen, nicht-Bisulfit-behandelten Sequenz erscheinen nicht methylierte CpG-Dinukleotide als TpG-Dinukleotide, wohingegen methylierte CpG-Dinukleotide auch CpG-Dinukleotide bleiben. Alle Cytosine außerhalb von CpG-Dinukleotiden sollten noch erfolgreicher Bisulfit-Behandlung als Thymidine erscheinen. Sequenzalignments wurden mit dem Programm Vector NTI (Invitrogen, Paisley, UK) durchgeführt.

D.13. Chromatin-Analysen

D.13.1. Micrococcus-Nuklease-Behandlung von kultivierten Zellen

Die Chromatin-Struktur des adenoviralen Transgenoms und der Insertionsstelle wurde in den Zelllinien T637, TR12 und in der parentalen Linie BHK21 bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit der Micrococcus-Nuklease behandelt, die DNA präferentiell zwischen Mononukleosomen schneidet. Eine geringe Sensitivität gegenüber dieser Nuklease wird als kompaktes, transkriptionell nicht aktives Chromatin interpretiert, eine hohe Sensitivität als „offene“ Chromatin-Struktur.

Zur Untersuchung wurde eine publizierte Methode (Boyes und Felsenfeld, 1996) wie folgt angewendet und modifiziert: Bei einer Konfluenz von ca. 90% wurden die Zellen mit eiskaltem PBS-d gewaschen, von den Zellkulturschalen abgeschabt und bei einer Konzentration von $6,6 \times 10^6$ Zellen pro ml in MNase-Puffer (150 mM Saccharose, 80 mM KCl, 30 mM HEPES, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂) aufgenommen. Nach Zugabe von 250 µg/ml Lysolezithin wurden die Zellen mit ansteigenden Mengen von Micrococcus-Nuklease (MBI Fermentas, Wilna, Litauen), 20 bis 100 Units pro $6,6 \times 10^6$ Zellen, 15 min lang bei 16°C behandelt. Anschließend wurde die DNA mittels Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation isoliert, die Fragmente in einem 1%igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt, mittels Southern-Transfer auf eine positiv geladene Membran (Hybond XL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) übertragen und mit Ad12-DNA, verschiedenen Ad12-Genom-Segmenten oder dem flankierenden, zellulären F5-Segment (Knoblauch et al., 1996) hybridisiert.

D.13.2. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Zur Bestimmung von Histonen, die an Promotorregionen im adenoviralen Transgenom in TR12 Zellen binden, wurde die ChIP-Methode eingesetzt. Proteine, die an DNA binden,

werden zunächst kovalent an die DNA gebunden, dann wird die DNA durch Scheren oder Nukleasen fragmentiert und mit einem Antikörper gegen das zu untersuchende Protein präzipitiert. DNA-Abschnitte, die an dieses Protein gebunden sind, können in einer PCR nachgewiesen werden.

ChIP-Analysen wurden nach bekannten Protokollen (Upstate, Lake Placid, NY, USA) mit einigen Modifikationen durchgeführt. Bei einer Konfluenz der Zellen von 90-95% wurden Proteine durch Zugabe von Formaldehyd bis zu einer Konzentration von 1% im Zellkulturmedium und einer Inkubation von 10 min bei 37°C an die DNA gebunden (engl.: cross-linking). Nach der Fixierung wurden die Zellen gründlich mit eiskaltem PBS-d gewaschen und in MNase-Puffer (150 mM Saccharose, 80 mM KCl, 30 mM Hepes, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂) bei einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml geschabt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 250 µg/ml Lysolecithin permeabilisiert. Das Chromatin wurde durch Zugabe von 100 U/ml Micrococcus-Nuklease (MBI Fermentas, Wilna, Litauen) und Inkubation für 10 min bei 37°C zu Mononukleosomen verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Die Zellen wurden pelletiert (700 ×g, 5 min, 4°C) und in 200 µl Lysis-Puffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,1, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin A) aufgenommen und 10 min lang auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden 15 min lang bei 5300 ×g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde 1:100 in Verdünnungspuffer (0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl, pH 8,1, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin A) verdünnt. Als Ausgangs-Proben wurden zwei 20 µl Aliquote entnommen. Durch Zugabe von 1 µl 5 M NaCl und Inkubation für 4 h bei 65°C wurde die Bindung der Proteine an die DNA revertiert. Immunopräzipitation, Waschschritte und Reversion der Proteinbindung an die DNA wurden nach etablierten Protokollen durchgeführt (Upstate, Lake Placid, NY, USA). Schein-Präzipitationen ohne Antikörperzugabe wurden als Kontrollen durchgeführt, um eine mögliche nichtspezifische Bindung des Chromatins zu erkennen. Die DNA wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation isoliert und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. 1-2 µl wurden für eine qPCR eingesetzt. Alle qPCRs wurden 3-fach ausgeführt. Die Bindung eines Proteins an eine Bestimmte DNA-Sequenz wurde in Prozent von präzipitiertem Chromatin im Vergleich zu dem Chromatin angegeben, das zur Präzipitation eingesetzt wurde.

E. Ergebnisse

E.1. Die Struktur und Sequenz des Ad12-Transgenoms in der revertanten Zelllinie TR12

Die Anordnung der integrierten adenoviralen DNA in TR12-Zellen wurde mit Hilfe von Restriktionsanalysen, Southern-Hybridisierungen und Sequenzierungen bestimmt. Ein Teil dieser Untersuchungen ist in Zusammenarbeit mit Prof. Indrikis Muiznieks aus Riga durchgeführt worden, der einige Male zu Gast in den Labors von Prof. Doerfler in Köln und Erlangen war. Die Karten in den Abbildung 12 und 13 zeigen die Positionen der Hybridisierungsproben und der relevanten Restriktionsstellen im Ad12-Genom bzw. im Transgenom der Zelllinie TR12. In Abbildung 12 C sind die Positionen der DNA-Sonden und die KpnI, SacI und KpnI+SacI Ad12-Fragmente, an denen sie hybridisieren, dargestellt.

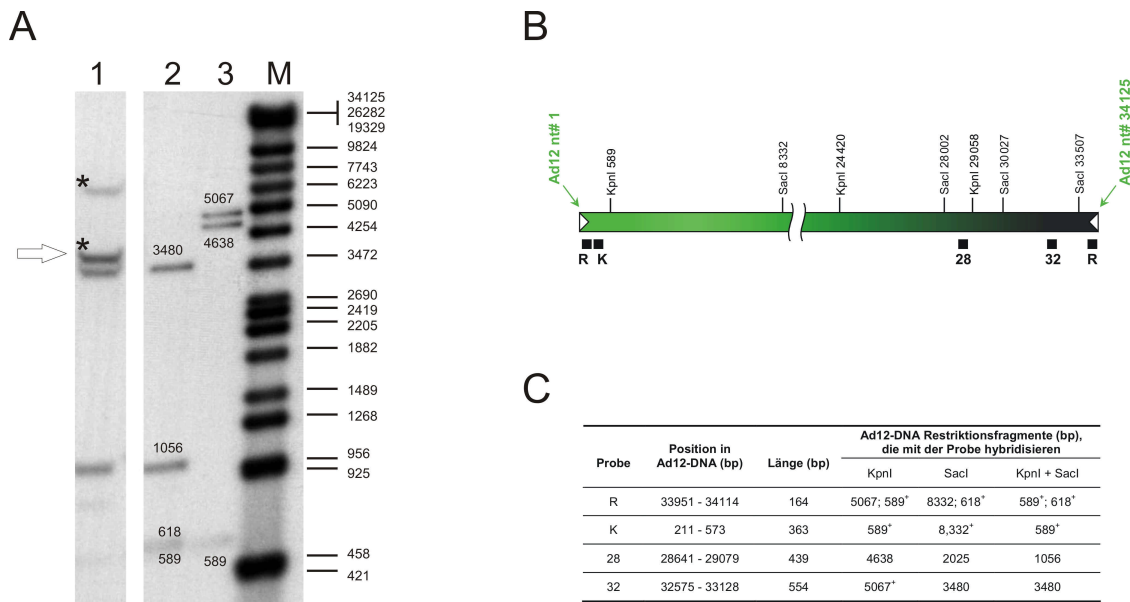


Abbildung 12. Identifizierung von zusätzlichen DNA-Fragmenten zur Charakterisierung der Verbindungsstelle von adenoviraler zu adenoviraler DNA in der Zelllinie TR12 (A) und Lokalisation der DNA-Hybridisierungssonden im Ad12-Genom (B und C). (A) 30 µg genomische DNA der Zelllinie TR12 wurde mit KpnI und SacI (Spur 1), 100 pg Ad12-DNA mit KpnI und SacI (Spur 2) oder mit KpnI (Spur 3) geschnitten. Spur M: Lambda-Marker, 3'-Enden-Markierung mit [α - 32 P]-dCTP. Als Hybridisierungsprobe wurde eine Mischung der Proben R, 32 und 28 verwendet. (B) Die Nummerierung des Ad12-Genoms stammt aus der Arbeit von Sprengel et al., 1994. Die für die Interpretation der Experimente relevanten KpnI- und SacI Schnittstellen sind angegeben. Die Positionen der Hybridisierungsproben sind unter dem Ad12-Genom (grün dargestellt) als schwarze Kästchen abgebildet. Die weißen Pfeilspitzen symbolisieren die invertierten Enden im adenoviralen Genom. (C) Beschreibung der DNA-Sonden: die Probe R stammt vom rechten Ende des Ad12-Genoms. 153 bp sind auch homolog zum linken Ende des Ad12-Genoms (bp 12 bis 164 der Ad12-Sequenz), 11 bp sind nicht homolog (bp 165 bis 175 der Ad12-Sequenz) zum linken Ende des Ad12-Genoms. Die invertierte terminale Sequenzwiederholung (engl.: inverted terminal repeat) von Ad12 ist 161 bp lang (Tolun et al., 1979; Sprengel et al., 1994).

KpnI- und SacI-Restriktionen ergaben zwei zusätzliche Ad12-spezifische DNA-Fragmente (engl.: off-size fragments), die an eine Mischung aus den Proben R, 32 und 28 hybridisierten (gekennzeichnet durch Sternchen in Abbildung 12) und nicht durch Spaltung von Ad12-DNA mit KpnI und SacI entstehen (Abbildung 12, Spur 2). In früheren Arbeiten (Knoblauch et al., 1996) wurde ein 5250 bp langes DNA-Fragment kloniert, welches direkt neben beiden Enden der integrierten Ad12-DNA liegt. Da dieses Fragment keine Restriktionsstellen für KpnI und SacI beinhaltet, überspannt das ~7 kbp lange off-size Fragment wahrscheinlich ein schon früher kloniertes DNA-Fragment, das die rechte Verbindung zwischen viraler und zellulärer DNA trägt (Knoblauch et al., 1996). Die Herkunft des ~4 kbp off-size Fragments konnte nicht mit früheren Daten erklärt werden.

DNA-Fragmente zwischen 3,5 und 4,5 kbp Länge wurden isoliert und in den pBS(+)-Vektor kloniert. In einem Kolonie-Transfer-Experiment (engl.: colony lift assay) konnte ein 3,9 kbp langes DNA-Fragment identifiziert werden, das gegen die Ad12-Proben R und 32 hybridisiert. Dieses Fragment wurde sequenziert und besteht aus Ad12-DNA, mit den Sequenzpositionen von Nukleotidpaar 33507 (SacI-Schnittstelle) bis Position 30196 im Ad12-Genom, der Sequenz ATCATC und den Nukleotidpaaren 8 bis 589 (KpnI-Schnittstelle) vom linken Ende der Ad12-DNA. Durch DNA-Sequenzierungen wurde gezeigt, dass beide Enden der integrierten DNA aus rechten Enden der Ad12-DNA bestehen, wobei das rechte Ad12-Ende am linken Rand des Integrats in invertierter Form vorliegt (Abbildung 13).

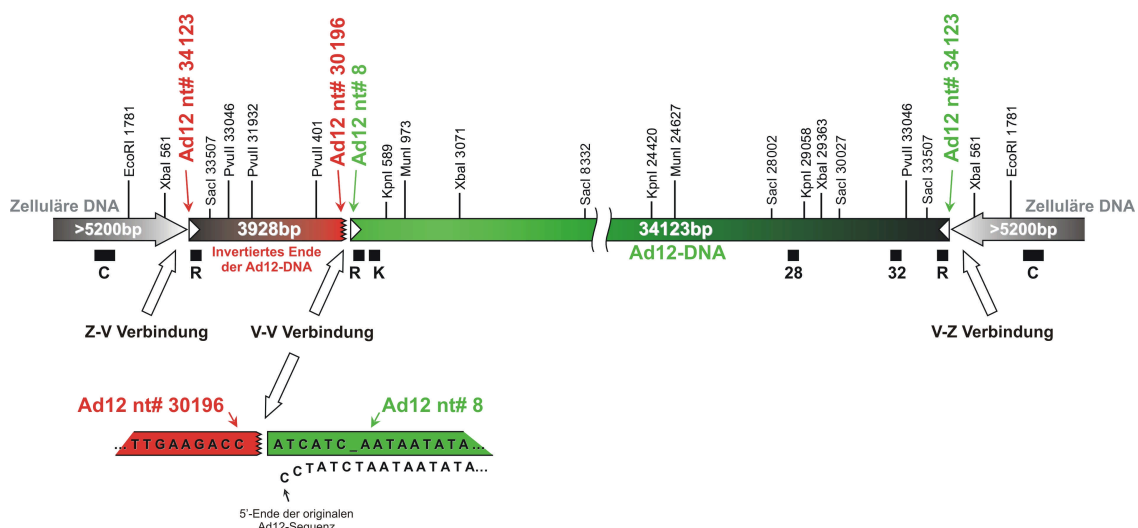


Abbildung 13. Schema des Transgenoms und der Integrationsstelle in der Zelllinie TR12. Diese Karte beruht auf Ergebnissen aus Restriktionsanalysen, Southern-Transfer-Hybridisierungen und Sequenzierungen. Die schwarzen Kästchen geben die Positionen von Hybridisierungssonden an (siehe auch Abbildung 12). Probe C ist ein 1165 bp langes XbaI-Fragment aus der dem Transgenom benachbarten zellulären DNA, das in früheren Arbeiten kloniert und sequenziert worden ist (Knoblauch et

al., 1996). Wichtige Restriktionsschnittstellen sind über der Karte dargestellt. Die weißen Pfeilspitzen stehen für die invertierten Enden im adenoviralen Genom. Der grüne Balken stellt die komplette Ad12-Kopie dar, der rote Balken die zweite, verkürzte und invertierte Ad12-Kopie. Die rechts und links angrenzenden zellulären DNA-Sequenzen sind in einem Bereich von mindestens 5,2 kbp identisch und palindromisch. Die Nummerierung stammt aus den Arbeiten von Sprengel et al., 1994. Die gezahnte Linie stellt die Verbindung der beiden adenoviralen Kopien im Transgenom und die mögliche Stelle dar, an der die übrigen adenoviralen Kopien der Zelllinie T637 während der Umwandlung zur Zelllinie TR12 verloren gingen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die DNA-Sequenz an der viralen Verbindungsstelle (V-V).

Ein 12,4 kbp langer Teil des adenoviralen Transgenoms in der Zelllinie TR12 wurde sequenziert, um zu untersuchen ob sich die integrierte Sequenz von der Virion-Sequenz wesentlich unterscheidet. Es wurden nur zehn Einzelnukleotidunterschiede (0,08%) im Vergleich zur veröffentlichten Ad12-DNA-Sequenz (Sprengel et al., 1994) gefunden. Auch die Sequenzen der Bisulfit-Experimente deuten auf eine fast identische Sequenz zwischen integrierter und Virion-DNA hin. Da in diesen Versuchen allerdings alle nicht-methylierten Cytosine als Thyminide erscheinen, erlaubt diese Methode nur eine begrenzte Aussage über die tatsächliche Sequenz.

Die Nukleotide 8 bis 34123, der kompletten Kopie eines Ad12-Genoms, scheinen authentische Ad12-DNA zu sein. Die ersten drei Nukleotide der kompletten adenoviralen Kopie unterscheiden sich von der Ad12-Sequenz, zudem fehlt das siebte Nukleotid der Virion-Sequenz in der integrierten DNA (Abbildung 13). Das erste Nukleotid der vollständigen Ad12-Kopie ist mit dem Nukleotid 30196 einer invertierten zweiten Ad12-Kopie verbunden, die vom rechten Ende des Adenovirus-Genoms stammt und nur 3928 bp lang ist. Beide Enden der integrierten Adenoviralen DNA sind also rechtsterminale Ad12-Sequenzen, die mit zellulärer DNA verbunden sind (Abbildung 13).

E.2. Analyse der Methylierungsmuster

Die Methylierungsmuster der integrierten adenoviralen DNA in T637- und TR12-Zellen wurden mit Hilfe der Bisulfit-Behandlung von genomischer DNA untersucht, da die Bestimmung von Methylierungsmustern mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen zwei Nachteile hat: (i) Nur etwa 10-15% der CpG-Dinukleotide liegen in Erkennungssequenzen von Restriktasen. (ii) Die Ergebnisse liefern nur Durchschnittswerte für den Methylierungszustand der CpGs in einer DNA-Präparation. Die Bisulfit-Methode erlaubt jedoch die Bestimmung des Methylierungszustandes jedes CpG-Dinukleotids auf Einzel-Molekülebene.

Abbildung 14 zeigt ein Beispiel für ein Ergebnis der Methylierungsmusteranalyse. Methylierte CpG-Dinukleotide werden in dieser Darstellung durch schwarze Kästchen, nicht-methylierte CpGs durch weiße Kästchen symbolisiert. Wenn PCR-Produkte überlappen, können einige CpG-Dinukleotide von beiden PCR-Produkten abgedeckt werden.

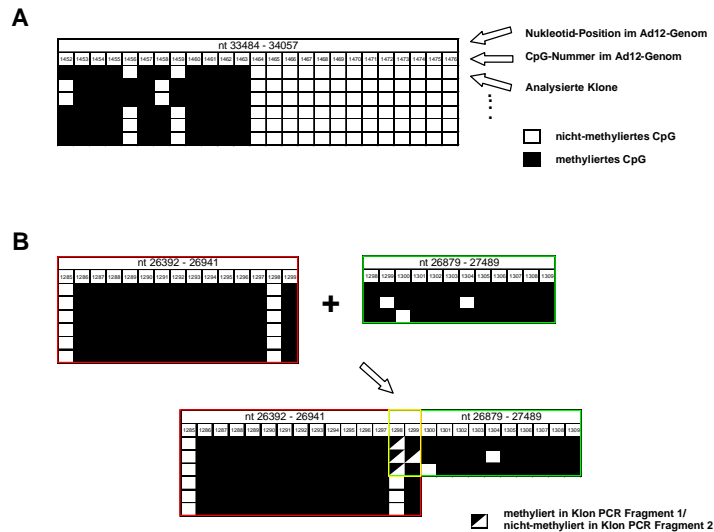


Abbildung 14. Nomenklatur der Methylierungsmusteranalyse. (A) Die oberste Zeile gibt die Position des klonierten PCR-Produkts im Ad12-Genom nach Sprengel et al., 1994 wieder. Jede Spalte repräsentiert ein CpG-Dinukleotid, die zweite Zeile gibt die Position des CpGs im Ad12-Genom an. Die Zeilen unter den CpG-Positionen stellen die analysierten Klone dar. Methylierte CpG-Dinukleotide sind durch schwarze Kästchen, nicht-methylierte durch weiße Kästchen dargestellt. (B) CpG-Dinukleotide können von benachbarten PCR-Produkten gleichermaßen abgedeckt sein. Ein Methylierungszustand, der zwischen den beiden PCR-Produkten nicht übereinstimmt, wird durch ein diagonal geteiltes schwarz-weißes Kästchen gekennzeichnet.

E.3. Methylierungsmuster des Ad12-Transgenoms in der revertanten Zelllinie TR12

Ein Ad12-Genom beinhaltet 1500 CpGs, das integrierte 3,9 kbp lange Fragment vom rechten Ende des Ad12 Genoms trägt 134 CpGs, so dass das adenovirale Transgenom der Zelllinie TR12 insgesamt 1634 CpGs umfasst, von denen 1633 auf ihren Methylierungsstatus untersucht wurden. Abbildung 15 zeigt die Zusammenfassung aller Ergebnisse. Die Nukleotid-Positionen der PCR-Fragment geben die Positionen im Ad12-Genom wieder. Zur Orientierung sind zusätzlich adenovirale Gene und Promotoren in grauen Balken dargestellt. 88% aller CpGs im Transgenom der TR12-Zellen sind methyliert, 118 CpGs sind vollständig nicht-methyliert, 81 Stellen sind wenigstens in einigen analysierten Klonen nicht-methyliert. Beide Enden des adenoviralen Transgenoms beinhalten Blöcke von nicht-methylierten CpGs (Abbildungen 15 und 16). Die restlichen nicht- oder nur teilweise methylierten Stellen sind vereinzelt über das gesamte Transgenom verteilt.

Abbildung 15 (S. 45). Vollständiges Methylierungsmuster des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie TR12. Der Methylierungsstatus der 1634 CpG-Dinukleotide wurde durch das Bisulfit-Protokoll der genomischen Sequenzierung bestimmt. Beide Enden der integrierten DNA sind nicht-methyliert, der übrige Teil ist stark methyliert mit vereinzelt nicht-methylierten Stellen. Methylierte CpG-Dinukleotide sind durch schwarze Kästchen, nicht-methylierte durch weiße Kästchen dargestellt. CpGs mit einem variablen Methylierungszustand sind durch diagonal geteilte schwarz-weiße Kästchen gekennzeichnet.

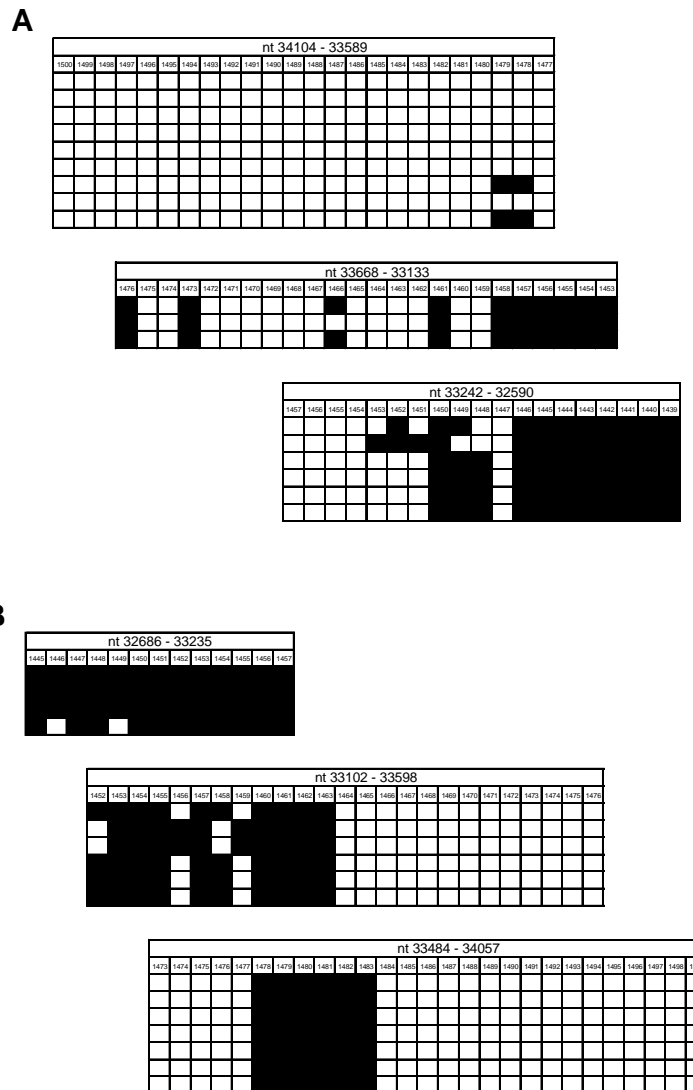


Abbildung 16. Methylierungsmuster des linken (A) und rechten Endes (B) der integrierten adenoviralen DNA in der Zelllinie TR12. Dargestellt sind jeweils die ersten bzw. letzten drei PCR-Fragmente des Ad12-Transgenoms.

Abbildung 17 zeigt PCR-Fragmente aus den Genbereichen des Hexons und des Terminalen Proteins sowie aus dem E2-Promotor. Das Hexon-Fragment beinhaltet sowohl zwei CpG-Dinukleotide, die in allen Klonen nicht-methyliert sind als auch sechs CpGs, die einen

variablen Methylierungszustand zwischen den untersuchten Klonen zeigen. Der Genombereich aus dem Terminalen Protein ist in allen Klonen vollständig methyliert. Das Fragment aus dem E2-Promotor zeigt drei CpGs mit einem konstanten nicht-methylierten Status. Methylierungsmuster aus weiteren Promotorbereichen sind in Abbildung 24 (S. 55) dargestellt.

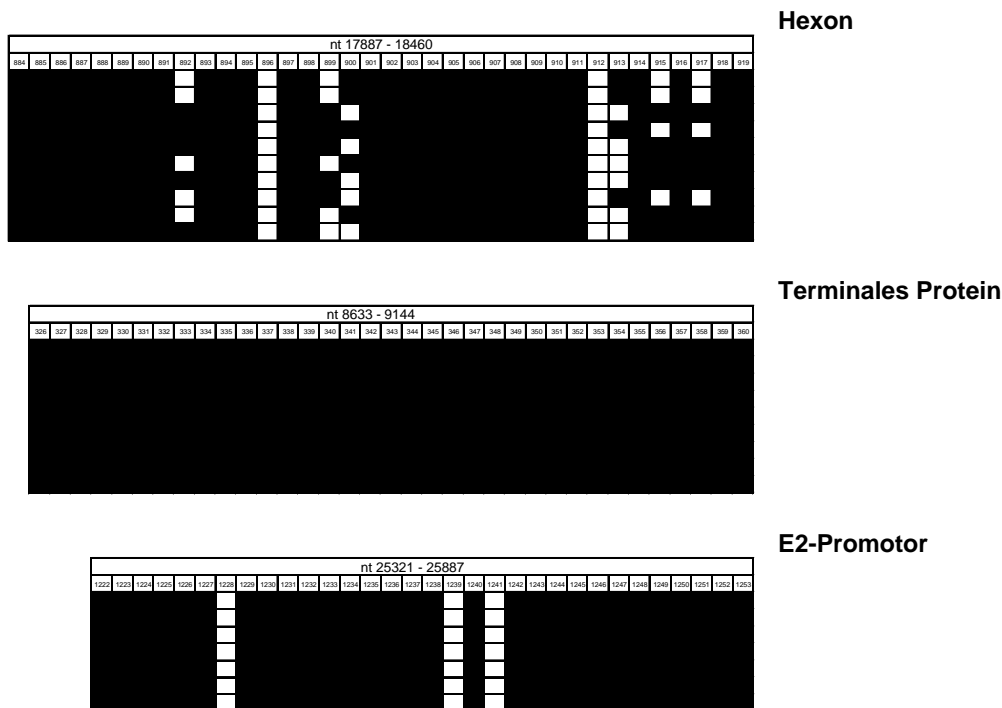


Abbildung 17. Methylierungsmuster von drei PCR-Fragmenten aus den Bereichen Hexon, Terminales Protein und E2-Promotor der Zelllinie TR12. Das Hexon-Fragment beinhaltet CpG-Dinukleotide, die in jedem untersuchten Klon nicht-methyliert sind und solche, die einen variablen Methylierungszustand zwischen den Klonen zeigen. Das Fragment aus dem Bereich des Terminalen Proteins ist vollständig methyliert. Der E2-Promotorbereich weist drei Stellen mit vollständig nicht-methylierten CpGs auf.

E.4. Methylierungsmuster in ausgewählten Bereichen des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie T637

Frühere Untersuchungen mit dem Restriktionsenzymopaar HpaII/MspI haben gezeigt, dass die integrierte Ad12-DNA in der Zelllinie T637 weniger stark methyliert ist als in der revertanten Zelllinie TR12 (Orend et al., 1995). Ob alle 15 adenovirale Kopien im Transgenom der T637-Zellen gleichermaßen methyliert sind oder ob sich das Methylierungsmuster zwischen den Kopien unterscheidet, ist nicht bekannt. Für einige Bereiche im adenoviralen Transgenom ist das Methylierungsmuster in der Zelllinie T637 mit der Bisulfit-Methode untersucht worden. Abbildung 24 zeigt einen Vergleich mit den entsprechenden Bereichen in der Zelllinie TR12. Die Bereiche in den E1A- und E1B-Promotorregionen sind in TR12-Zellen tatsächlich

vollständig methyliert und vollständig nicht-methyliert in T637-Zellen. Die E4-Promotoregion (rechtes Ende des Transgenoms in TR12) ist in T637-Zellen ebenfalls vollständig nicht-methyliert, in TR12-Zellen sind etwa die Hälfte der untersuchten CpG-Dinukleotide methyliert. Der Methylierungsstatus im adenoviralen späten Hauptpromotor (engl.: **m**ajor **l**ate **p**romotor, MLP) ist in beiden Zelllinien etwa gleich. Die Methylierungsmuster in den T637-Zellen können nur einen Überblick über die 15 Kopien geben, da eine Zuordnung eines Methylierungsmuster von einem Klon zu einer bestimmten adenoviralen Kopie nicht möglich ist.

Die mit der Bisulfit-Methode untersuchten Methylierungsmuster der Ad12-Transgenome in den Zelllinien T637 und TR12 bestätigen die Ergebnisse aus früheren Arbeiten (Orend et al., 1995), die zeigten, dass die integrierte adenovirale DNA in TR12-Zellen stärker methyliert ist als in T637-Zellen. Zudem konnten durch die hochauflösende Bisulfit-Methode detaillierte Angaben über hypo- und hypermethylierten Genregionen in den Ad12-Transgenomen gemacht werden.

E.5. Kontrollexperimente zur Methylierungsmusteranalyse

Zur Überprüfung des Methylierungsmusters des adenoviralen Transgenoms der Zelllinie TR12 sind in einigen Bereichen unabhängige Bisulfit-Behandlungen mit dem MethylEasy-Kit durchgeführt worden. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse für drei solcher Bereiche. Für die meisten CpG-Dinukleotide stimmt der Methylierungsstatus zwischen den beiden Experimenten überein.

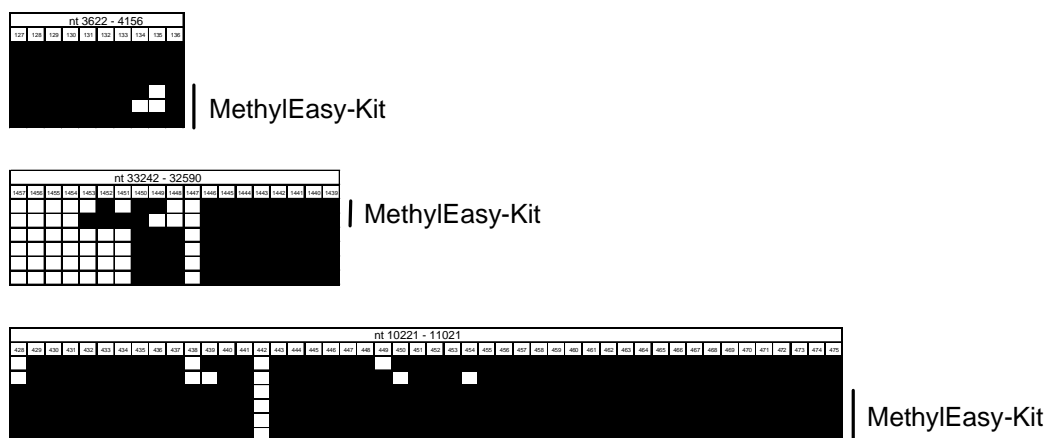


Abbildung 18. Kontrollen der Methylierungsmusteranalyse (I). Der Methylierungszustand wurde in einigen Bereichen der adenoviralen Transgenoms der Zelllinie TR12 durch unabhängige Bisulfit-Behandlungen mit dem MethylEasy-Kit überprüft.

Zur weiteren Kontrolle wurden für die Bereiche von CpG-Nummer 1127 bis 1168 in der vollständigen Ad12-Kopie des Transgenoms sowie von 1476 bis 1439 in der zweiten verkürzten Ad12-Kopie mehrere PCR-Fragmente generiert, um den Methylierungszustand zu bestimmen (Abbildung 19). Auch bei diesen Kontrollen stimmte der Methylierungszustand für die meisten CpG-Dinukleotiden zwischen den untersuchten Klonen überein.

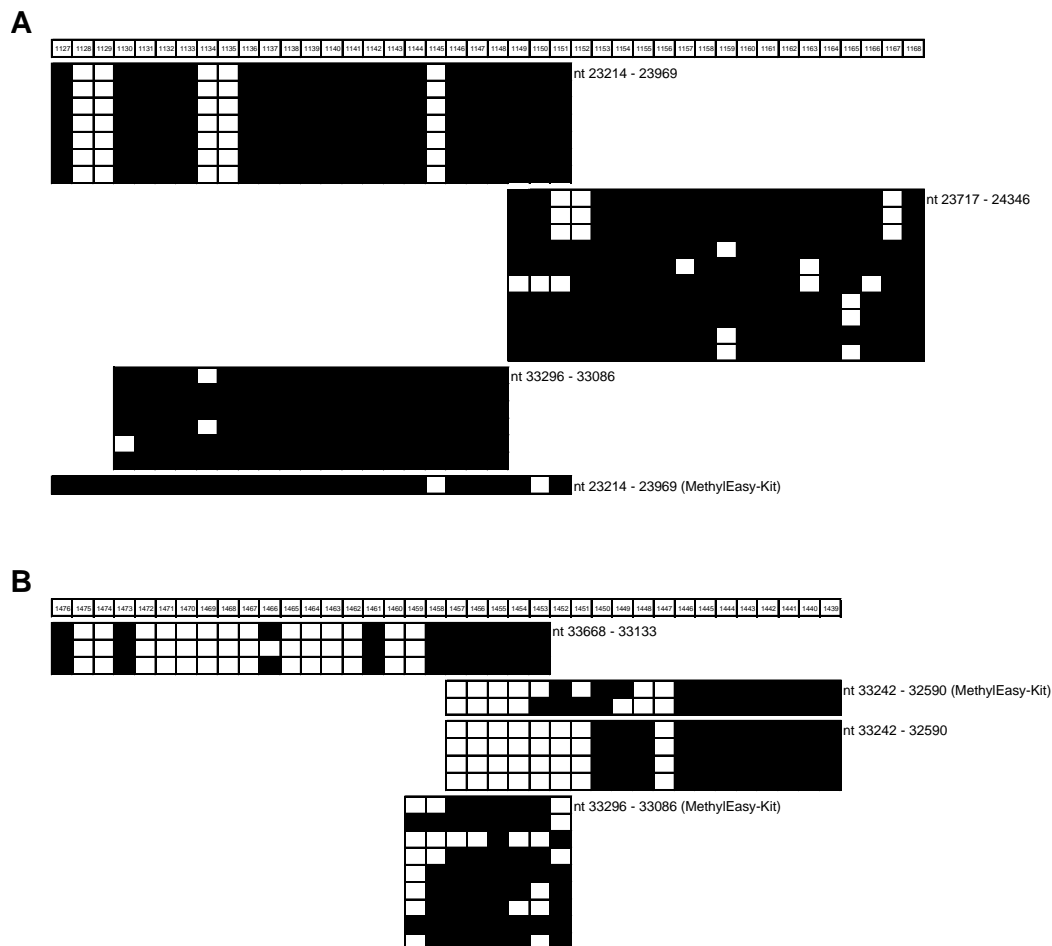


Abbildung 19. Kontrollen der Methylierungsmusteranalyse (II). Für zwei Bereiche aus der vollständigen adenoviralen Kopie (A) und aus der verkürzten zweiten Ad12-Kopie (B) des Transgenoms in TR12-Zellen wurden mehrere PCR-Fragmente zur Überprüfung des Methylierungszustandes eingesetzt.

Für jedes PCR-Fragment der Ad12-DNA in T637- und TR12-Zellen wurden zur Bestimmung des Methylierungsmusters mindestens drei Klone analysiert. Zur Validierung der Ergebnisse wurden in einigen Fällen mehrere unabhängige Bisulfit-Experimente durchgeführt. PCR-Amplifikationen, Reinigungen und Klonierungen können bestimmte Methylierungszustände von DNA-Sequenzen bevorzugen, so dass eine Variabilität zwischen verschiedenen Experimenten und PCR-Amplifikaten möglich ist. Die Ergebnisse des Methylierungsmusters im Ad12-Transgenom der Zelllinie TR12 zeigen, dass es neben konstant methylierten oder

nicht-methylierten CpGs auch Stellen mit flexiblem Methylierungszustand gibt, wie z.B. im Bereich des Hexon-Proteins (Abbildung 17, S. 47). In vivo können Zellen mit Hilfe von variablen Methylierungszuständen auf äußere Faktoren reagieren oder auch den unterschiedlichen Proteinbedarf der Zelle während des Zellzyklus regulieren, so dass ein gleiches Methylierungsmuster in jeder Zelle eines Gewebes oder in einer Zellkultur nicht zu erwarten ist.

Bei der Bisulfit-Reaktion (Frommer et al., 1992; Clark et al., 1994) können Cytosine nur in einzelsträngiger DNA zu Uracilen konvertieren, so dass eine komplette Denaturierung und ein Vermeiden des Renaturierens der DNA-Einzelstränge wichtige Voraussetzungen für eine komplette Reaktion sind. Eine robuste Denaturierung wurde unter folgenden Bedingungen gewährleistet: 0,3 N NaOH, 15 min bei 37°C, 2 min bei 100°C und schnelles Abkühlen 2 min lang auf Eis. Verbleibende unreaktierte Cytosine würden falsch-positive 5-Methyl-Cytosine vortäuschen, die entweder vereinzelt oder gehäuft in bestimmten Genomabschnitten auftreten können. Die Verteilung solcher nicht-konvertierten Cytosine kann sequenzabhängig (Harrison et al., 1998) und -unabhängig (Ramsahoye et al., 2000) sein. Um einen ersten Hinweis auf eine komplette Konversion zu bekommen, wurden die klonierten PCR-Fragmente mit AluI (Erkennungssequenz: AGCT) geschnitten. Klone mit unvollständiger Konversion enthalten danach einen zusätzlichen Schnitt und wurden nicht mehr berücksichtigt.

Eine unterschiedliches Methylierungsmuster von DNA-Molekülen führt nach Behandlung mit Bisulfit zu Molekülen mit variierendem Cytosinegehalt, die dann in einer PCR präferenziell amplifiziert werden könnten (Warnecke et al., 1997). Um diese Tendenz zu vermeiden, sind die Zyklenzahlen in der PCR möglichst gering gehalten worden. Zudem sind für jedes PCR-Fragment mindestens drei Klone untersucht worden. In Kontrollexperimenten wurden die Ergebnisse für bestimmte Regionen durch mehrere unabhängige Bisulfit-Reaktionen bestätigt.

E.6. Micrococcus-Nuklease-Sensitivität der Ad12-Transgenome und ihrer Umgebung in den Zelllinien T637 und TR12

Micrococcus-Nuklease schneidet DNA bevorzugt in der Verbindungs-DNA zwischen Nukleosomen. Transkriptionell aktives Chromatin (Euchromatin) ist weniger stark kondensiert als dicht gepacktes, transkriptionell nicht aktives Chromatin (Heterochromatin) und daher sensibler für eine Micrococcus-Nuklease-Aktivität. Eine Restriktion genomischer DNA mit Micrococcus-Nuklease erzeugt ~150 bp lange DNA-Fragmente. Diese Länge entspricht der DNA, die um den Nukleosomen-Kern gewunden ist. Ein nicht vollständiger

Verdau erzeugt Multimere der Nucleosomen, so dass im Agarosegel eine Nucleosomen-Leiter sichtbar wird.

BHK21-Zellen, als nicht-transgene Kontrolle, T637- und TR12-Zellen sind mit Lysolezithin permeabilisiert worden und anschließend mit 0 bis 100 Units Micrococcus-Nuklease pro $6,6 \times 10^6$ Zellen 15 min lang bei 16°C behandelt worden. Die DNA-Fragmente wurden isoliert und wie beschrieben in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Membran transferiert. Als Hybridisierungssonden wurden Ad12-Segmente aus den Promotorbereichen E1A, E1B und major late sowie aus dem zellulären F5-Bereich, der das Transgen flankiert (Knoblauch et al., 1996), verwendet (Abbildung 20 D).

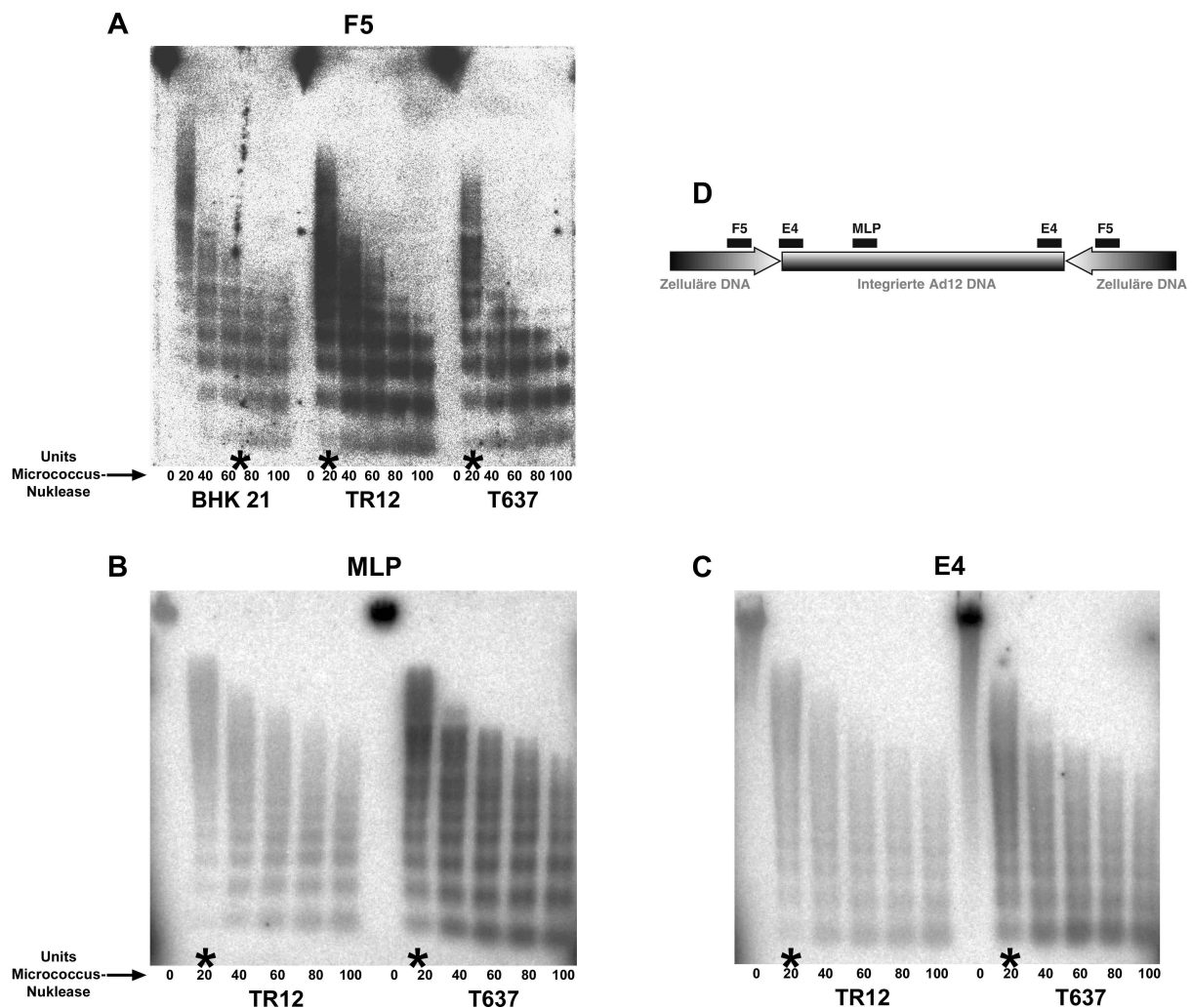


Abbildung 20. Organisation des Chromatins im Ad12 Transgenom und seiner Umgebung im zellulären Genom. Die Chromatin-Struktur wurde im zellulären F5-Segment in den Zelllinien BHK21, T637 und TR12 (A) sowie in den Ad12-Regionen des Hauptpromotors (B) und der E4-Promotorregion (C) der Zelllinien T637 und TR12 bestimmt. Die Micrococcus-Nuklease-Units, die ausreichend sind, um Mononucleosomen zu generieren, sind mit Sternchen gekennzeichnet. (D) Schematische Darstellung der Positionen der Hybridisierungssonden.

Das Ausmaß der DNA-Degradation durch Micrococcus-Nuklease-Behandlung wurde als Hinweis auf die Chromatin-Struktur und den Verpackungsgrad interpretiert. Mononukleosomen im zellulären F5-Segment wurden in den Zelllinien T637 und TR12 jeweils mit 20 Units Micrococcus-Nuklease erreicht (Abbildung 20 A, S. 51). Die Intensität dieser Signale für Mononukleosomen wird bei der Zelllinie BHK21 erst mit 60 bis 80 Units erreicht (gekennzeichnet durch Sternchen in Abbildung 20 A). Die zelluläre, dem Ad12-Transgenom angrenzende F5-DNA ist also in den Zelllinien T637 und TR12 sensitiver für eine Micrococcus-Nuklease als in der parentalen Zelllinie BHK21. Ein Vergleich mit den adenoviralen Hybridisierungssonden ergab keinen Unterschied in der Sensitivität für Micrococcus-Nuklease zwischen den Zelllinien T637 und TR12 (Abbildung 20 B und C, S. 51).

Die Ergebnisse zeigen, dass die adenoviralen Transgenome in den Zelllinien T637 und TR12 in Nukleosomen organisiert sind. Im Vergleich zur parentalen Zelllinie BHK21 ist die benachbarte zelluläre DNA in den transgenen Zelllinien T637 und TR12 sensitiver gegenüber Micrococcus-Nuklease, so dass die Aufnahme fremder DNA in das Genom der Zelllinie BHK21 die Chromatin-Struktur an der Integrationsstelle verändert hat.

E.7. Transkription der integrierten Ad12-Gene und Bezug zu DNA-Methylierungsmustern in den Zelllinien T637 und TR12

Gesamtzelluläre RNA wurde aus den T637- und TR12-Zellen isoliert, revers transkribiert und die cDNA mit quantitativer PCR analysiert (siehe Methoden, S. 33 und 34). Die Spezifität der Fluoreszenzsignale für das gesuchte PCR-Produkt wurde mit scheinumgeschriebenen cDNAs ((-)RT-Kontrollen) und Wasserkontrollen überprüft. Außerdem wurden die qPCR-Produkte mit Hilfe einer Dissoziationskurve und der Auftrennung im Agarosegel analysiert.

Abbildung 21, 22, 23 und Tabelle 1 (S. 53 und 54) zeigen als Beispiel die Auswertung der qPCR-Ergebnisse für das adenovirale E1B-Gen. Die qPCRs wurden in 3-fachen (Proben und Standards) bzw. doppelten Ansätzen (Kontrollen) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde cDNA eingesetzt, die aus 10 ng gesamtzellulärer RNA umgeschrieben oder zum Schein umgeschrieben ((-)RT-Kontrollen) worden war.

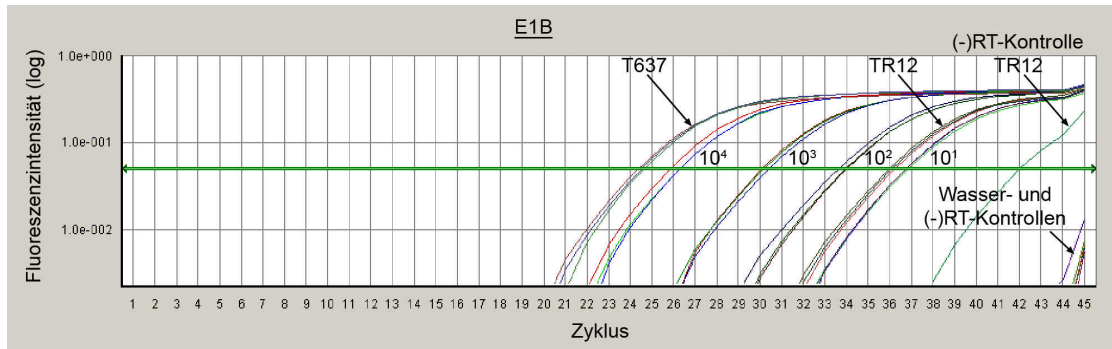


Abbildung 21. Bestimmung der Transkription des adenviralen E1B-Gens in den Zelllinien T637 und TR12 durch qPCR. Durch die Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green in doppelsträngige DNA kann eine Zunahme der PCR-Amplifikate in Abhängig des qPCR-Zyklus in Echtzeit (engl.: real-time) dargestellt werden. Zum Vergleich der Reaktionen dient der Schwellwert (grüne Linie). In beiden Zelllinien T637 und TR12 konnten Transkripte des E1B-Gens nachgewiesen werden. Tabelle 1 zeigt die detaillierte Auswertung.

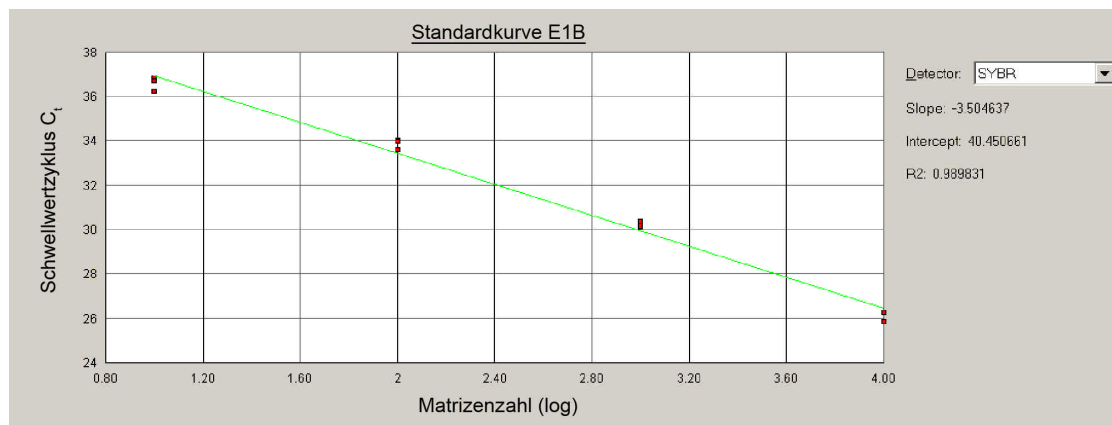


Abbildung 22. qPCR-Standardkurve bei der Bestimmung der Transkription des adenviralen E1B-Gens. Die Schwellwertzyklen der Standardproben wurden gegen die bekannte Anzahl an Ausgangsmolekülen aufgetragen und eine Annäherungsgerade errechnet. Die Parameter Slope (deutsch: Steigung), Intercept (deutsch: Schnittpunkt) und R2 geben die Effizienz und Empfindlichkeit der qPCR an.

Die Werte für die Steigung der Standardkurve (engl.: slope), der Schnittpunkt mit der Ordinate (engl.: intercept) und des R2-Parameters (siehe Methoden, S. 35) belegen, dass die qPCR eine ausreichende Effizienz und Empfindlichkeit besitzt, um die Anzahl der Ausgangsmoleküle in den Proben durch die Standards angeben zu können (Abbildung 22). Eine der beiden (-)RT-Kontrollen der Zelllinie TR12 zeigt ein spätes Fluoreszenzsignal. Die Dissoziationskurve zeigt jedoch, dass das Signal nicht spezifisch für das untersuchte E1B-Gen ist (Abbildung 23, S. 54).

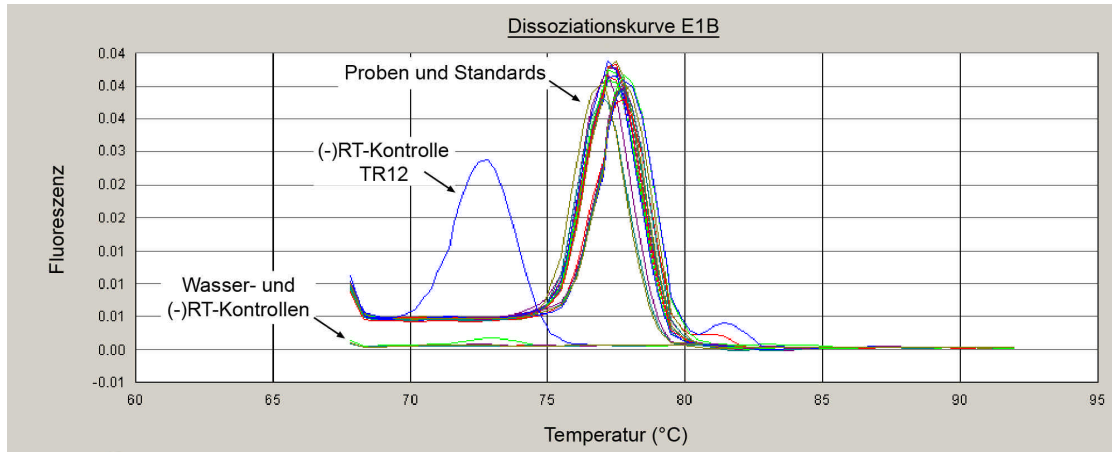


Abbildung 23. Dissoziationskurve zur Überprüfung der Spezifität von qPCR-Produkten des adenoviralen E1B-Gens. Nach dem letzten Zyklus der qPCR erhöht das Gerät schrittweise die Temperatur der Proben und misst den Unterschied der Fluoreszenz zum vorherigen Temperaturschritt. Da unterschiedliche PCR-Produkte oft bei verschiedenen Temperaturen dissoziieren, kann mit einer Dissoziationskurve die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte überprüft werden.

Tabelle 1. Auswertung der qPCR-Ergebnisse für die Transkription des adenoviralen E1B-Gens in der Zelllinie TR12.

Probe	Schwellwertzyklus C _t	Standardabweichung	Anzahl der Moleküle	Mittelwert	Standardabweichung des Mittelwerts
Standard 10 ⁴ -Moleküle	25,83	0,249	10000		
Standard 10 ⁴	26,26	0,249	10000		
Standard 10 ⁴	26,26	0,249	10000		
Standard 10 ³	30,09	0,136	1000		
Standard 10 ³	30,16	0,136	1000		
Standard 10 ³	30,36	0,136	1000		
Standard 10 ²	34,00	0,23	100		
Standard 10 ²	33,97	0,23	100		
Standard 10 ²	33,59	0,23	100		
Standard 10 ¹	36,22	0,321	10		
Standard 10 ¹	36,82	0,321	10		
Standard 10 ¹	36,71	0,321	10		
E1B T637	24,33	0,13	39681,67	36402,00	3128,087
E1B T637	24,59	0,13	33451,54	36402,00	3128,087
E1B T637	24,48	0,13	36072,78	36402,00	3128,087
E1B TR12	36,09	0,38	17,51	16,04	3,711
E1B TR12	36,69	0,38	11,82	16,04	3,711
E1B TR12	35,99	0,38	18,79	16,04	3,711
E1B T637 (-)RT	-				
E1B T637 (-)RT	-				
E1B TR12 (-)RT	42,01		0,359		
E1B TR12 (-)RT	-				
E1B Wasser	-				
E1B Wasser	-				

Die Transkription der adenoviralen Gene wurden mit dem Transkriptionsniveau des zellulären beta-Aktin-Gens verglichen, dessen Transkription in den Zelllinien T637 und TR12 etwa gleich hoch war. In der Zelllinie TR12 konnte eine Transkription nur für die E4-Region nachgewiesen werden, alle anderen untersuchten Ad12-Gene waren fast komplett ausgeschaltet. In der Zelllinie T637 werden die Regionen E1A, E1B und E4 transkribiert. Transkripte der Hexon-, Penton- und Protease-Gene konnten in den T637- und TR12-Zellen nur in geringen Mengen nachgewiesen werden.

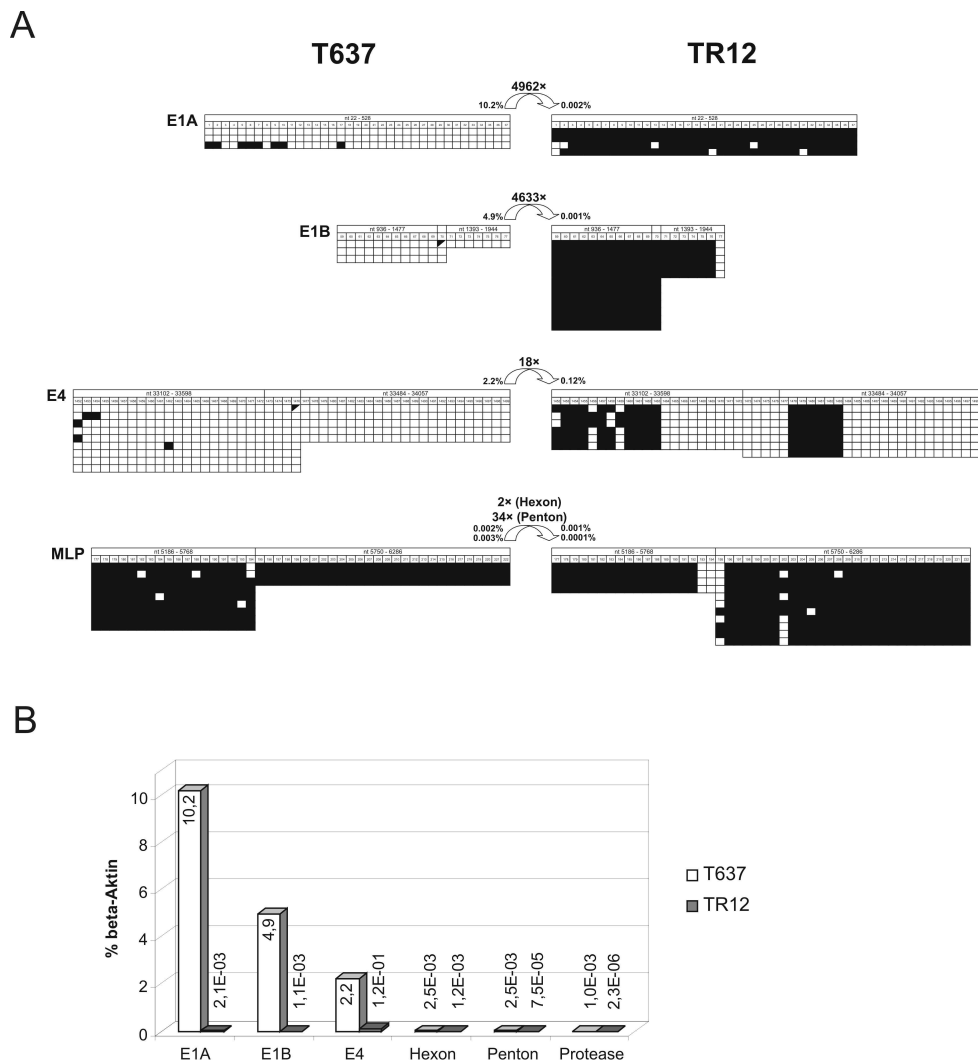


Abbildung 24. Gegenüberstellung von Methylierungsmustern in ausgewählten Ad12-Bereichen (A) und Transkriptionsraten adenoviraler Gene (B) in den Zelllinien T637 und TR12. (A) Dargestellt sind die Methylierungsmuster in den Ad12-Promotorbereichen E1A, E1B, major late und E4 der Zelllinien T637 und TR12. Schwarze Kästchen repräsentieren methylierte, weiße Kästchen nicht-methylierte CpG-Dinukleotide. CpGs mit variablem Methylierungsstatus sind durch diagonal geteilte, schwarz-weiße Kästchen gekennzeichnet (siehe Abbildung 14). Die Pfeile geben den Unterschied der Transkriptionsraten zwischen den Zelllinien T637 und TR12 an. Die Prozentangaben stellen die adenoviralen Transkriptionslevel im Vergleich zum zellulären beta-Aktin-Gen dar. (B) Diagramm der Ad12-Transkriptionsraten. Die Transkriptionsaktivität wurde durch quantitative PCR bestimmt.

In der Zelllinie TR12 sind die E1A- und E1B-Promotorregionen nahezu vollständig methyliert und in der Zelllinie T637 komplett nicht-methyliert. Im späten Hauptpromotor sind in beiden Zelllinien fast alle CpG-Dinukleotide methyliert. Die E4-Region ist in der Zelllinie T637 vollständig nicht-methyliert und in TR12 nur teilweise methyliert (Abbildung 24). Die inverse Korrelation von DNA-Methylierung und der Transkription von adenoviralen Genen wurde in früheren Veröffentlichungen nachgewiesen (Doerfler, 1981; Vardimon et al., 1982; Doerfler, 1983; Langner et al., 1984).

Da die Ad12-Segmenten E1A, E1B und E4 in der Zelllinie T637 wenig oder vollständig nicht-methyliert sind, werden diese Regionen transkribiert. Auch die nur teilweise methylierte E4-Region in der Zelllinie TR12 wird transkribiert. Das Verhältnis der Transkriptionsraten von 18:1 für die E4-Region zwischen den Zelllinien T637 und TR12 kann durch eine unterschiedliche Gendosis erklärt werden, T637 besitzt etwa 15 Kopien der E4-Region, TR12 nur zwei. Auch für die vollständig methylierten Promotoren E1A und E1B der TR12-Zellen sowie des adenoviralen Hauptpromotors in beiden Zelllinien T637 und TR12 konnten geringe Mengen der RNA-Transkripte nachgewiesen werden.

Die nicht-methylierten E1A-, E1B- und E4-Promotoreregionen der Zelllinie T637 erlauben eine effiziente Transkription der integrierten Ad12-DNA in diesen Bereichen (Abbildung 24 B). Durch die sensitive qPCR-Methode wurden geringe Mengen an späten Transkripten der Ad12 Gene Hexon, Penton und der viralen Protease in den Zelllinien T637 und TR12 nachgewiesen. In frühere Untersuchungen zur adenoviralen Transkription mit weniger empfindlichen Methoden konnte in der Zelllinie T637 und in einigen anderen Ad12-transformierten oder Ad12-induzierten Tumorzellen keine Transkriptionsaktivität der späten Ad12-Gene gezeigt werden (Ortin et al., 1976; Schirm und Doerfler, 1981).

E.8. Histon-Modifikationen in den Ad12-Transgenomen der Zelllinien T637 und TR12

Die Behandlung von genomischer DNA mit Micrococcus-Nuklease hat gezeigt, dass das adenovirale Transgenom in der Zelllinie TR12 in Nukleosomen organisiert ist. Mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP, engl.: **chromatin immunoprecipitation**) wurden Histon-Modifikationen des Ad12-Transgenoms der Zelllinie TR12 in den adenoviralen Bereichen E1A, E1B, E4 und Hauptpromotor untersucht. Der Grad der Präzipitation im Vergleich zum eingesetzten Chromatin gilt als Ausmaß der Histon-Modifikationen in den untersuchten Genombereichen und wird in Prozent angegeben. Die Präzipitationsraten wurden durch quantitative PCR bestimmt. Hyperacetylierte Histone H3 und H4 werden in transkriptionell aktivem und offenem Euchromatin gefunden (Brown, 1966; Hebbes et al.,

1988; Roth et al., 2001; Eberharter und Becker, 2002). Kondensiertes, transkriptionell reprimiertes Chromatin ist u.a. durch hypoacetylierte Histone H3 und H4 sowie methylierte Lysinreste 9 und 20 der Histone H3 bzw. H4 charakterisiert (Nishioka et al., 2002; Rice et al., 2002; Fang et al., 2002). Das zelluläre, transkriptionell aktive beta-Aktin-Gen diente als Kontrolle für die untersuchten Zustände des Chromatins. Für die Präzipitation wurden folgende Antikörper gegen die genannten Histon-Modifikationen eingesetzt: Anti-acetyl-Histon H3, Anti-acetyl-Histon H4, Anti-trimethyl-Histon H3 Lysin 9 und Anti-trimethyl-Histon H4 Lysin 20.

Abbildung 25 zeigt als Beispiel die qPCR-Ergebnisse aus dem Bereich des adenoviralen Hauptpromotors in den T637-Zellen. Die relative Kopienzahl der untersuchten adenoviralen Genomabschnitte wurde vor und nach der Antikörper-Präzipitation durch qPCR bestimmt und verglichen. Für die Werte vor der Präzipitation („Ausgangschromatin“) wurden zweimal ein Fünfhundertstel des zur Präzipitation benutzten Chromatins eingesetzt (siehe Methoden S. 39). Alle qPCRs wurden 3-fach durchgeführt. Da ein um 3,32 Zyklen höherer Schwellwertzyklus C_t einer zehnfachen Anzahl an Ausgangsmolekülen in der qPCR entspricht, können die Proben miteinander verglichen werden. Durch eine Schein-Präzipitation ohne Antikörper wird der Anteil einer unspezifischen Bindung des Chromatins, z.B. an die verwendete Protein A-Agarose, bestimmt. Dieser Anteil wird von der tatsächlichen Präzipitation abgezogen. Die Spezifität der Fluoreszenzsignale für das gesuchte PCR-Produkt wurde mit Wasserkontrollen und einer Dissoziation der Amplifikate überprüft. Das Vorhandensein der untersuchten Histon-Modifikationen in den Nukleosomen der Ad12-Genomabschnitten wurde als Präzipitationsrate im Vergleich zum eingesetzten Chromatin angegeben (Abbildung 26, S. 57).

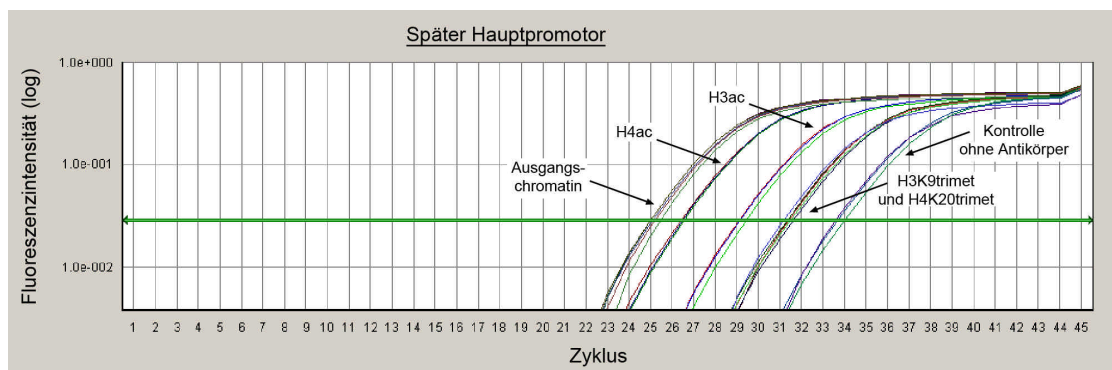


Abbildung 25. Beispiel zur Bestimmung der Histon-Modifikationen in Bereichen des adenoviralen Transgenoms in den Zelllinien T637 und TR12. Dargestellt sind die qPCR-Ergebnisse für vier untersuchte Histon-Modifikationen im Bereich des Ad12-Hauptpromotors im Transgenom der Zelllinie T637. Alle qPCRs wurden 3-fach durchgeführt. Für den Ausgangs-Chromatin-Wert wurde nur ein Fünfhundertstel des zur Präzipitation benutzten Chromatins verwendet.

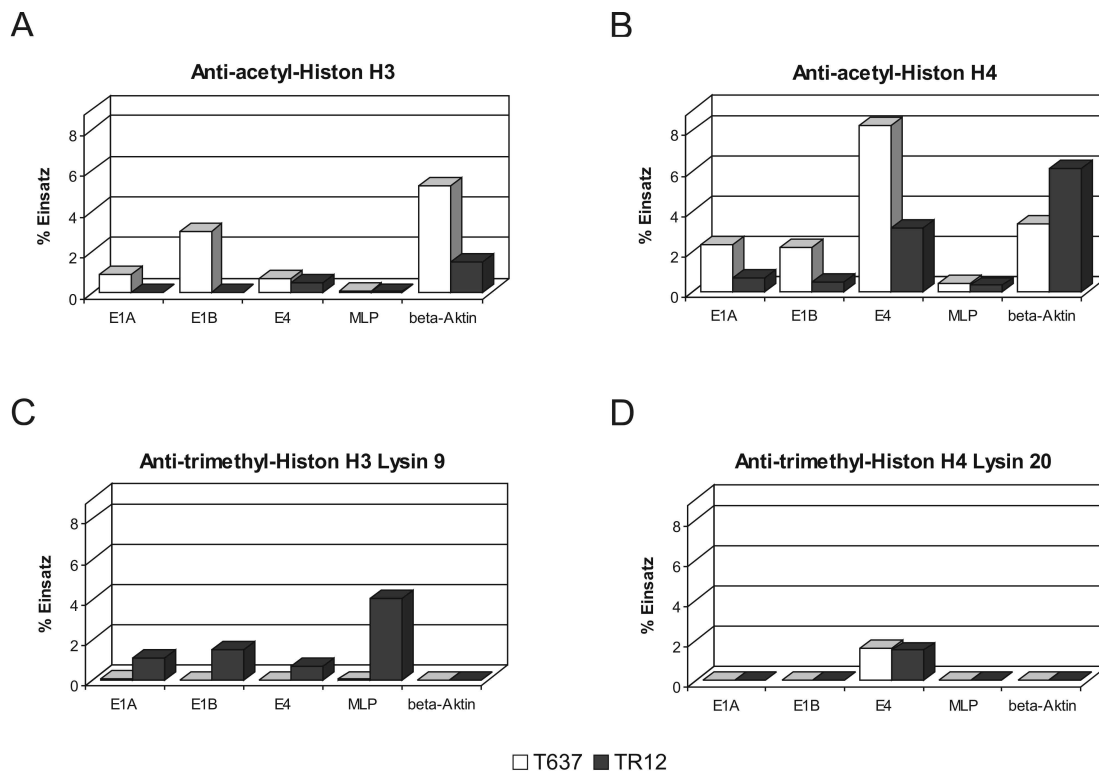


Abbildung 26. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) von modifizierten Histonen in verschiedenen Ad12-Promotorregionen der Zelllinien T637 und TR12. Quervernetztes Chromatin wurde mit Antikörpern gegen acetylierte Histone H3 (A), acetylierte Histone H4 (B), trimethylierte Histone H3 am Lysin 9 (C) und trimethylierte Histone H4 am Lysin 20 (D) präzipitiert. Das Ausmaß der Präzipitation wurde durch quantitative PCR ermittelt und im Vergleich zum Chromatin angegeben, das zur Präzipitation eingesetzt wurde.

Die Acetylierungen der Histone H3 und H4 entsprechen den Transkriptionsraten und Methylierungsmustern der adenoviralen Gene in den Zelllinien T637 und TR12 (Abbildung 24, S. 55). In den Ad12-Promotorbereichen E1A und E1B der Zelllinie T637 sind die Histone H3 und H4 acetyliert, während keine (Histon H3) bzw. eine geringere (Histon H4) Acetylierung in den TR12-Zellen nachgewiesen werden konnte. Für den in beiden Zelllinien transkribierten E4-Bereich konnte sowohl eine Acetylierung der Histone H3 als auch H4 festgestellt werden, die jeweils in den T637-Zellen stärker ausgeprägt ist. Für den in beiden Zelllinien methylierten und reprimierten späten Hauptpromotor konnte jeweils nur ein geringer Acetylierungsgrad ermittelt werden. Eine Methylierung des Histons H4 am Lysin 20 konnte nur in den untersuchten adenoviralen Bereichen in den TR12-Zellen nachgewiesen werden. Histone H4 mit einer Trimethyl-Modifikation am Lysin 20 wurden in beiden Zelllinien nur in den E4-Promotorbereichen gefunden. Das zelluläre beta-Aktin-Gen zeigt in

den Zelllinien T637 und TR12 acetylierte Histone H3 und H4 und keine der untersuchten methylierten Histon-Modifikationen.

Die untersuchten Histon-Modifikationen in ausgewählten Ad12-Promotorbereichen belegen, dass die Regulation der Transkription der integrierten adenoviralen ähnlich wie die von zellulären Genen verläuft.

F. Diskussion

Die Integration fremder DNA in Säugetier-Genome hat wichtige Konsequenzen für die Stabilität der Genome sowie für die Methylierung und die Transkription der fremden- und der Wirts-DNA. In vielen molekularbiologischen und medizinischen Bereichen spielt die Insertion fremder DNA in ein etabliertes Genom eine wichtige Rolle, z.B. bei artifiziellen Transfektionen, der Erschaffung transgener Organismen, Knockin- / Knockout-Experimenten oder bei gentherapeutischen Ansätzen. Neben der offensichtlichen Störung an der Insertionsstelle durch Unterbrechung der Wirtsgenom-DNA beeinflusst die fremde DNA auch das Methylierungsmuster und die Transkription von zellulärer DNA in der Umgebung der Integrationsstelle, aber auch in entfernten Genombereichen (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999; Muller et al., 2001; Diplomarbeit N. Hochstein, 2003).

F.1. Struktur des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie TR12

Die Struktur des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie TR12 wurde durch Restriktionsanalysen und Southern-Experimente (Abbildung 13, S. 42) sowie durch Sequenzierungen bestimmt. Es ist 38 kbp lang und besteht aus einer kompletten Ad12-Genomkopie und einem 3,9 kbp-Fragment einer zweiten adenoviralen Kopie. Dieses Fragment stammt vom rechten Ende eines Ad12-Genoms und liegt invertiert vor, so dass das interne Ende des kleinen Fragments mit Nukleotid #1 der kompletten Ad12-Kopie verbunden ist. Beide Enden der integrierten DNA stellen also rechtsterminale Ad12-Sequenzen dar, die mit zellulärer DNA verbunden sind. Die auf beiden Seiten der integrierten Ad12-DNA benachbarten zellulären DNA-Sequenzen sind auf einer Länge von >5,2 kbp identisch und palindromisch. Die ersten drei Nukleotide der kompletten adenoviralen Kopie unterscheiden sich von der originalen Ad12-Sequenz, zudem fehlt das siebte Nukleotid der Virion-Sequenz in der integrierten DNA. Zusätzlich konnten in 12 kbp des Transgenoms nur zehn weitere Einzelnukleotidaustausche beobachtet werden. Die wenigen Nukleotidaustausche könnten durch natürliche Fluktuation entstanden sein.

Die Struktur des adenoviralen Transgenoms in der Zelllinie TR12 mit den flankierenden invertierten Wiederholungen gleicht dem Aufbau von einigen repetitiven Elementen, die insgesamt ~45% des humanen Genoms ausmachen (Venter et al., 2001; Lander et al., 2001; Jordan et al., 2003), so dass fremde integrierte DNA in langzeit-kultivierten Zellen ein

geeignetes Model für Untersuchungen von repetitiven Elementen im humanen Genom sein kann.

F.2. Methylierungsmuster des Ad12-Transgenoms in der Zelllinie TR12

In früheren Arbeiten wurde mit Hilfe von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen gezeigt, dass die integrierte adenovirale DNA in der Zelllinie TR12 stärker methyliert ist als in der ursprünglichen Zelllinie T637 (Orend et al., 1995). Mit der damals verfügbaren Methode konnten allerdings nur etwa 10% aller CpG-Dinukleotide erfasst und der Methylierungszustand lediglich als Mittelwert von vielen TR12-Zellen angegeben werden. Mit dem in der vorliegenden Arbeit angewendeten Bisulfit-Protokoll für das genomische Sequenzieren können individuelle DNA-Moleküle und deren Methylierungsmuster in Einzel-CpG-Auflösung analysiert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass 88% aller CpG-Dinukleotide des Ad12-Transgenoms der Zelllinie TR12 methyliert sind. Beide Enden der integrierten DNA sind nicht-methyliert und bestehen aus invertierten E4-Regionen des Ad12-Genoms (Abbildung 15, S. 45). Eine mögliche Erklärung für die nicht-methylierten Enden des adenoviralen Transgenoms ist ein Selektionsvorteil der Zellen durch die Transkription der entsprechenden viralen Gene, die erst durch die Hypomethylierung im E4-Promotorbereich möglich wird. Fast die Hälfte der nicht-methylierten CpGs befindet sich in Blöcken an den Enden des Ad12-Transgenoms, die restlichen sind einzeln, wahrscheinlich sequenzunabhängig und ohne ein Muster über das gesamte Transgenom verteilt. Eine biologische Bedeutung dieser isolierten nicht-methylierten CpGs bleibt offen, ein Einfluss auf die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren ist allerdings auch durch vereinzelte nicht-methylierte CpGs möglich.

F.3. De novo Methylierung und Stabilität integrierter DNA

Fremde DNA wird nach Integration in ein Wirtszellgenom häufig methyliert. Die hohe Homologie zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Methyltransferasen ist ein Hinweis auf eine Beteiligung der DNA-Methylierung bei der Verteidigung des Wirtszellgenoms vor fremder invasiver DNA auch in höheren Organismen (Bestor et al., 1988). Eine de novo Methylierung von integrierter Ad12-DNA ist bekannt (Sutter et al., 1978; Sutter und Doerfler, 1980).

Die adenoviralen Sequenzen sind in der Zelllinie TR12 stärker methyliert als in der parentalen Linie T637 (Orend et al., 1995 und Abbildung 24, S. 55, in vorliegender Arbeit); folglich sind

die am stabilsten integrierten Ad12-Sequenzen hypermethyliert. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass das hypermethylierte Ad12-Transgenom der TR12-Zellen bereits in den T637-Zellen methyliert vorlag oder erst nach dem Exzisionsereignis hypermethyliert wurde. Mit der verwendeten Bisulfit-Methode kann zwischen dem Methylierungsstatus einzelner Ad12-Kopien in der Zelllinie T637 nicht unterschieden werden.

Der Verlust der meisten adenoviralen Genom-Kopien während der Reversion einer T637-Zelle zur Zelllinie TR12 verlief nach einem unbekanntem Exzisionsmechanismus, der aber durch Auto-Inkubation von T637-Zellkernen nachgeahmt werden konnte (Eick et al., 1983). Es gibt Hinweise, dass palindromische Sequenzen bei der Exzision von viraler DNA aus zellulärer DNA eine Rolle spielen. Beide Enden des adenoviralen Transgenoms in T637- und TR12-Zellen und die benachbarte zelluläre DNA sind palindromisch (Abbildung 13, S. 42). Die benachbarte zelluläre DNA bleibt nach der Entstehung der TR12-Zellen unverändert. Könnte der Exzisionsmechanismus durch den Methylierungszustand der transgenen DNA gesteuert worden sein, so dass nicht-methylierte Sequenzen bevorzugt ausgeschnitten wurden, weil ihre Chromatin-Struktur vielleicht nicht so kompakt ist wie die von methylierter DNA?

Die *de novo* Methylierung spielt nicht nur bei der Integration viraler DNA in ein Wirtszellgenom eine wichtige Rolle, sie ist auch bei der Reetablierung von genomweiten Methylierungsmustern während der Embryonalentwicklung (Razin et al., 1984) beteiligt und ist bei der Entstehungen einiger Krebsarten (Überblick bei Baylin und Herman, 2000) und der Tumorentwicklung (Cheng et al., 2001; Zhu et al., 2004) nachgewiesen worden. Die Ergebnisse zur Struktur des Ad12-Transgenoms in den Zelllinien T637 und TR12 (Abbildung 13 und Hochstein et al., 2007) zeigen, dass der Status von fremder DNA in langzeit-kultivierten Zellen mit dem von repetitiven Elementen des menschlichen Genoms vergleichbar sein könnte.

Etwa 45% des humanen Genoms setzen sich aus repetitiven Elementen zusammen (Venter et al., 2001; Lander et al., 2001; Jordan et al., 2003). Diese bestehen aus zwischengelagerten Sequenzwiederholungen, die von eigenständig und nicht-eigenständig transponierbaren Elementen sowie kurzen oder komplexen Tandemwiederholungen (Satelliten-DNA in zentromerischen und juxtazentromerischen Regionen) abstammen (Prak und Kazazian, 2000; Weiner, 2002; Deiningner et al., 2003). Viele CpG-Dinukleotide weisen einen anomalen Methylierungszustand in menschlichen Tumoren auf: bei einer globalen Hypomethylierung liegen einige CpG-Inseln hypermethyliert vor (Gama-Sosa et al., 1983; Feinberg und Vogelstein, 1983a; Feinberg und Vogelstein, 1983b). Die häufige Hypomethylierung von

repetitiven Elementen bei verschiedenen Tumorarten ist wahrscheinlich für die globale Hypomethylierung verantwortlich, die in vielen Tumoren beobachtet wurde (Ehrlich, 2002).

F.4. Selektivität der de novo Methylierung

Der Mechanismus durch den fremde DNA nach Integration in ein Wirtszellgenom de novo methyliert wird ist unbekannt. Die Sequenz des Integrats, die Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit der Promotorstärke (Hertz et al., 1999) oder die zelluläre DNA in der Umgebung der fremden DNA könnten wichtige Faktoren sein, die die de novo Methylierung beeinflussen. Neben Transposons und DNA-Sequenzen, die durch deren Aktivität entstehen, wie z.B. die gleichgerichteten Sequenzwiederholungen (engl.: direct repeats), die bei der Integration von Transposons zustande kommen, werden multiple integrierte Sequenzkopien und Zusammenlagerungen von palindromischen Sequenzwiederholungen als mögliche Ausgangssignale für eine de novo Methylierung diskutiert (siehe Einleitung S. 15, Wolffe und Matzke, 1999; Matzke et al., 2000). Da in den Zelllinien T637 und TR12 die Enden der integrierten adenoviralen DNA und die benachbarte zelluläre DNA in einem Bereich von mindestens 5,2 kbp (Knoblauch et al., 1996) palindromisch sind, könnten diese Sequenzen für die de novo Methylierung der integrierten Ad12-DNA verantwortlich sein.

F.5. Transkription integrierter Gene und DNA-Methylierung in Ad12-Promotorregionen der Zelllinien T637 und TR12

Ohne epigenetische Regulationsmechanismen, nur durch einen Gendosis-Effekt, müssten sich die Transkriptionsraten der integrierten adenoviralen Gene zwischen den Zelllinien T637 (15 Ad12-Kopien) und TR12 (eine Ad12-Kopie) um den Faktor 15 unterscheiden. Der E4-Promotorbereich ist in der Zelllinie T637 vollständig und in der Zelllinie TR12 fast vollständig nicht-methyliert (Abbildung 24, S. 55). Die Transkriptionsraten unterscheiden sich hier in einem Bereich, der auf den Gendosis-Einfluss zurückgeführt werden kann. Auch die durch den in beiden Zelllinien fast vollständig methylierten späten Hauptpromotor kontrollierten Gene Hexon und Penton unterscheiden sich in ihrer Transkription in einem ähnlichen Ausmaß. Die E1A- und E1B-Promotoren sind in den T637-Zellen vollständig nicht-methyliert, während sie in den TR12-Zellen vollständig methyliert sind. Transkripte der entsprechenden Gene können in den TR12-Zellen kaum nachgewiesen werden, so dass die Transkriptionsrate in den T637-Zellen fast 5000 Mal höher ist. Auch der vollständig methylierte Hauptpromotor lässt in beiden Zelllinien eine minimale Transkription der

untersuchten späten Gene Hexon und Penton zu. Diese schwache Transkription könnte auf den hemimethylierten Zustand der DNA, der kurz nach jeder Replikationsrunde der DNA auftritt, zurückzuführen sein oder durch eine restliche Transkription trotz vollständiger Methylierung erklärt werden. Eine Transkription der späten Gene in der Zelllinie T637 und in verschiedenen Ad12-transformierten Zellen sowie in Ad12-induzierten Hamsterzell-Tumoren konnte in früheren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden (Ortin et al., 1976; Schirm und Doerfler, 1981). Eine mögliche biologische Relevanz dieser Transkripte bleibt unklar.

F.6. Nukleosomen-Struktur und Histon-Modifikationen der Ad12-Transgenome in den Zelllinien T637 und TR12 und ihrer Umgebung

In dieser Studie wurden ausgewählte Segmente des Ad12-Genoms oder das zelluläre F5-Fragment (Knoblauch et al., 1996) neben der adenoviralen Insertionsstelle als Hybridisierungsproben in Microcococcus-Nuklease-Experimenten eingesetzt, um die Nukleosomen-Struktur innerhalb der Ad12-Transgenome und in der benachbarten zellulären DNA in den Zelllinien T637, TR12 und BHK21 zu untersuchen. Da das Chromatin im zellulären F5-Bereich der Ad12-transgenen Zelllinien T637 und TR12 empfindlicher gegenüber Microcococcus-Nuklease-Behandlung ist als Chromatin in der ursprünglichen Zelllinie BHK21, scheint die zelluläre Chromatin-Struktur an der Insertionsstelle viraler DNA offener zu sein (Abbildung 20, S. 51). Bei der illegitimen Integration von fremder DNA in Wirtszellgenome scheint die Insertionsstelle zwar zufällig zu sein, aber dennoch abhängig von einer offenen Chromatin-Struktur zu sein. Die Insertionsstellen sind häufig auch transkriptionell aktiv (Gahlmann et al., 1984; Schulz et al., 1987), so dass eine offene Chromatin-Struktur eine wichtige Voraussetzung für den Zugang von Transkriptionsfaktoren und fremder DNA zur genomischen DNA ist (Takata et al., 1998; Smith, 2001; Wurtele et al., 2003). Eine offene Chromatin-Struktur der Insertionsstelle von fremder DNA in Wirtszellgenome wurde auch bei einer Reihe von Integrationsereignissen nachgewiesen, wie z.B. bei Retroviren (Überblicke bei Sandmeyer et al., 1990; Cereseto und Giacca, 2004), HIV-1 bei AIDS-Patienten (Tsyba et al., 2004), HPV-16 bei einer Cervix-Karzinom-Zelllinie (Bauer-Hofmann et al., 1996), HPV-18 bei HeLa-Zellen (Rosl et al., 1989), EBV bei Burkitt's-Lymphom-Zellen (Jox et al., 1997), AAV bei humanen Zellen (Lamartina et al., 2000) oder bei artifizierlicher illegitimer Integration (Lee et al., 2005).

Das Nukleosomenmuster nach Microcococcus-Nuklease-Behandlung (Mono-, Di-, Tri- usw. Nukleosomen) zeigt, dass die Ad12-Transgenome in den T637- und TR12-Zellen die zelluläre

Organisation des Chromatins in Nukleosomen angenommen haben. Die untersuchten Ad12-Segmente sind gleichermaßen für Micrococcus-Nuklease empfindlich (Abbildung 20).

Die Ad12-Transgenome sind in Nukleosomen organisiert und transkriptionell aktiv. Unterliegt die Transkription der adenoviralen Gene derselben epigenetischen Regulation wie die der zellulären Gene? Zu diesem Zweck wurden Histon-Modifikationen untersucht, die charakteristisch für transkribierte oder abgeschaltete Gene sind. Acetylierte Histone H3 und H4 sind in aktiven Genen nachgewiesen worden (Roth et al., 2001; Eberharter und Becker, 2002); während das Fehlen der Histon-Acetylierungen und Trimethylierungen der Histone H3 und H4 an den Lysinen 9 bzw. 20 charakteristisch für transkriptionell nicht aktives Chromatin sind (Nishioka et al., 2002; Rice et al., 2002; Fang et al., 2002). Die gefundene Acetylierung der Histone H3 und H4 entspricht der nachgewiesenen Transkription der untersuchten Gene: die Histone in den Promotorbereichen der transkribierten Gene sind acetyliert, während inaktive Promotoren nicht acetyliert sind (Abbildung 26 A und B, S. 58). Eine Trimethylierung der Histone H3 am Lysin 9 konnte in fast allen Promotorbereichen von nicht aktiven Gene nachgewiesen werden, nur der vollständig DNA-methylierte und transkriptionell abgeschaltete späte Hauptpromotor der T637-Zellen zeigt eine schwache Methylierung der Histone H3 am Lysin 9 (Abbildung 26 C). DNA-Methylierung und eine Methylierung des Histons H3 am Lysin 9 können sich gegenseitig verstärken (siehe Einleitung S. 9; Brenner und Fuks, 2006), vielleicht ist dieser Rückkopplungsmechanismus in den T637-Zellen noch nicht etabliert und die DNA-Methylierung reicht zur transkriptionellen Genabschaltung aus.

Eine Trimethylierung der Histone H4 am Lysin 20 konnte nur in den E4-Promotorbereichen der Zelllinien T637 und TR12 nachgewiesen werden (Abbildung 26 D). In menschlichen und arthropoden Zellen wurde eine Beteiligung von methylierten Histonen H4 am Lysin 20 bei der transkriptionellen Abschaltung von Genen und bei der Kondensation von Chromatin während der Mitose nachgewiesen (Nishioka et al., 2002; Rice et al., 2002; Fang et al., 2002). Die Methylierung von Lysin 20 der Histone H4 nimmt während der S-Phase in menschlichen Zellen zu und erreicht ihren Höhepunkt während der Mitose. Der Anstieg dieser Histon-Methylierung folgt der zunehmenden Expression des Gens PR-Set7, welches die Methylierung katalysiert (Rice et al., 2002). Die Methylierung der Histone H4 am Lysin 20 und die Acetylierung am Lysin 16 sind invers korreliert (Nishioka et al., 2002), so dass diese Modifikationen gegensätzlich während des Zellzyklus agieren. Eine Methylierung der Histone H4 am Lysin 20 hält einen abgeschalteten Zustand des Chromatins durch Inhibition der transkription-aktivierenden Acetylierung des Lysins 16 der Histone H4 aufrecht. In der

Spaltheffe spielt die Methylierung der Histone H4 am Lysin 20 allerdings keine Rolle bei der Regulation von transkriptionellen Chromatin-Zuständen. Vielmehr soll diese Modifikation hier an der DNA-Reparatur nach Doppelstrangbruch beteiligt sein (Sanders et al., 2004). Die Methylierung des Histons H4 am Lysin 20 durch die Histon-Methyltransferase Set9 rekrutiert und fixiert Crb2 an der Doppelstrangbruchstelle. Crb2 ist ein Protein, das an der Kontrolle des Zellzyklus und der DNA-Reparatur beteiligt ist. Die Regulation des Crb2-Säugetierhomologs 53BP1 verläuft ähnlich (Nakamura et al., 2005), so dass eine Funktion der Methylierung der Histone H4 am Lysin 20 bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen auch bei Säugetieren möglich ist.

Eine dreifache Methylierung der Histone H3 am Lysin 9, die charakteristisch für abgeschaltete Gene ist (Jenuwein und Allis, 2001; Schreiber und Bernstein, 2002), korreliert in vorliegender Arbeit mit den Transkriptionsraten der untersuchten adenoviralen Gene und des zellulären beta-Aktin Gens. Allerdings konnte eine ähnliche Funktion der Trimethylierung von Histonen H4 am Lysin 20 bei der Stilllegung von Genen wie die Trimethylierung der Histone H3 am Lysin 9 in den untersuchten Genen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr konnte eine Trimethylierung der Histone H4 am Lysin 20 nur in den adenoviralen E4-Segmenten der Zelllinien T637 und TR12 gezeigt werden. Die E4-Segmente liegen unmittelbar an den Enden der Ad12-Transgenome in den Zelllinien T637 und TR12, in der Nähe der möglichen zellulären Stellen von DNA-Doppelstrangbrüchen, die die Integration der Ad12-Genome in das Wirtszellgenom ermöglichten. Zudem ist für die Transkriptionsregulation durch den Übergang von funktionellen Chromatin-Zuständen gezeigt worden, dass eine Histon-H4-Hyperacetylierung eine Trimethylierung des Histons H4 am Lysin 20 ausschließt (Sarg et al., 2004), so dass eine Funktion dieser Trimethylierungs-Modifikation neben der Regulierung der Chromatin-Struktur auch bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen denkbar ist, da in dieser Arbeit beide Histon-Modifikationen parallel in transkriptionell aktivem Chromatin nachgewiesen werden konnten (Abbildung 26, S. 58).

G. Zusammenfassung

Ein großer Teil des Genoms von Säugetieren besteht aus repetitiven Elementen und integrierter fremder DNA, wie z.B. viralen Retrotransposons. Eine natürlich vorkommende oder artifiziell herbeigeführte Integration fremder DNA in ein Wirtszellgenom kann die Transkription und den Methylierungszustand sowohl der fremden, als auch der zellulären DNA beeinflussen. Veränderungen von Methylierungsmustern spielen bei vielen biologischen Prozessen, wie z.B. bei der Embryonalentwicklung oder der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit wurden der Methylierungszustand, die Transkription und die Nukleosomenorganisation sowie Histon-Modifikationen von integrierter Adenovirus-Typ-12-(Ad12)-DNA in den transformierten Zelllinien T637 und TR12 untersucht.

Die Zelllinie T637 wurde durch Infektion von nicht-permissiven BHK21-Hamsterzellen mit Ad12 erzeugt. T637-Zellen haben etwa 15 Kopien des Ad12-Genoms an einer Stelle ihres Genoms aufgenommen. Bei fortlaufender Kultivierung konnten morphologische Revertanten isoliert werden, die unterschiedliche Mengen der ursprünglich integrierten adenoviralen DNA verloren haben. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das Transgenom der revertanten TR12-Zelllinie aus einem vollständigen Ad12-Genom sowie einem 3,9 kbp langen rechten Ad12-Genom-Ende besteht und invertiert an das linke Ende der vollständigen Ad12-Kopie anschließt.

In vorliegender Arbeit wurde der Methylierungszustand aller 1634 CpG-Dinukleotide im Ad12-Transgenom der Zelllinie TR12 mit Hilfe der Bisulfit-Methode untersucht. Über 85% der CpGs zeigen einen vollständig methylierten Status. Fast die Hälfte der 200 nicht- oder nur teilweise methylierten CpGs befinden sich an den Enden des Transgenoms, während sich die restlichen nicht-methylierten Stellen vereinzelt auf den sonst stark methylierten inneren Teil des Ad12-Transgenoms verteilen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die adenoviralen Integrate in den Zelllinien T637 und TR12 in Nukleosomen organisiert sind. Eine wichtige Voraussetzung für die Integration von DNA ist eine offene Chromatin-Struktur an der Insertionsstelle, die in den Zelllinien T637 und TR12 ebenfalls belegt werden konnte. Da trimethylierte Histone H4 am Lysin 20 nur an den Enden der Ad12-Transgenome nachgewiesen werden konnten, ist eine Beteiligung dieser Histon-Modifikation an der Reparatur oder Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen möglich.

Des Weiteren konnte dokumentiert werden, dass die Transkription der integrierten adenoviralen Gene vom Methylierungszustand der jeweiligen Promotoren abhängt. Eine substantielle Transkription konnte nur in den nicht- oder hypomethylierten Promotorregionen der Gene E4 in T637- und TR12-Zellen sowie E1A und E1B in T637-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte in beiden Zelllinien eine geringe Transkription von Ad12-Genen mit hypermethylierten Promotoren, wie z.B. dem späten Hauptpromotor, beobachtet werden.

Diese Arbeit beschreibt erstmals den kompletten und detaillierten Methylierungszustand eines integrierten adenoviralen Transgenoms und zeigt, dass Ad12-Transgenome der gleichen epigenetischen Regulation durch DNA- und Histon-Modifikationen unterliegen wie die Wirtszellgenome. Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen daher zu einem besseren Verständnis der de novo Methylierung- und der Stabilität von integrierter fremder DNA bei und geben wichtige Aufschlüsse über zelluläre epigenetische Prozesse, die von Transgenomen übernommen werden können.

H. Abstract

An essential part of mammalian genomes is made up of repetitive elements and other integrated foreign DNA, e.g. viral retrotransposons. The integration of foreign DNA into cellular genomes, either naturally occurring or artificially achieved, can alter the methylation and transcription of the integrated and the host cell DNA, even in regions remote from the insertion site. Alterations of methylation patterns also play a major role in many biological fields, e.g. in embryonic development and cancer formation. In this study we investigated the methylation status, the transcription profile and the nucleosome structure as well as histone modifications of integrated DNA in the human Adenovirus-type-12-(Ad12)-transformed cell lines T637 and TR12.

Cell line T637 was generated by infection of non-permissive BHK21 hamster cells with Ad12. T637 cells carry about 15 copies of Ad12 DNA integrated at a single site in their genomes. During continuous culturing several morphological revertants arose spontaneously, like the cell line TR12 which had lost major parts of the Ad12-transgenome. Within this study TR12 cells were found to retain only one complete adenoviral copy plus a 3.9 kbp fragment of a second copy, derived from the right terminus of Ad12 which abuts the left end of the full length copy in an inverted fashion.

We also investigated the methylation patterns of all 1634 CpG dinucleotides harboured by the Ad12-transgenome in cell line TR12, using the bisulfite protocol of genomic sequencing. Over 85% of the CpGs show a fully methylated status. About half of the 200 un- or partly unmethylated CpGs are located at both ends of the viral integrate, the other half spreads over the strongly methylated inner part of the integrate.

This work proved that the adenoviral transgenomes in cell lines T637 and TR12 are organized in nucleosomes. An open chromatin structure at the insertion site is known to be an important precondition of foreign DNA integration and could also be confirmed in cell lines T637 and TR12 within this study. The results also suggest a function of histone H4 trimethylation at lysine 20 during recognition or repair of DNA double-strand breaks, as it was found exclusively accumulated at both ends of the Ad12-transgenome.

In addition, this work could show that the level of transcription of the integrated viral genes depends on the degree of methylation in the corresponding promoter regions. Substantial transcription could only be detected from the un- or hypomethylated E4 promoter in cell lines T637 and TR12 as well as from the E1A- and E1B region in cell line T637. But interestingly,

even the completely methylated promoters, like the MLP, were found to be compatible with low levels of transcription.

This work reveals for the first time a detailed methylation pattern of an integrated adenoviral transgenome and presents evidence that Ad12-transgenomes underlie the same epigenetic regulations through DNA- and histone-modifications as the host genomes. Therefore these results contribute to a better understanding of the de novo methylation and the stability of integrated foreign DNA and shed light on the cellular epigenetic processes transgenomes can adopt.

I. Literaturverzeichnis

- Aapola, U., R. Lyle, K. Krohn, S. E. Antonarakis, and P. Peterson.** 2001. Isolation and initial characterization of the mouse Dnmt3l gene. *Cytogenet. Cell Genet.* **92**:122-126.
- Angelman, H.** 1965. 'Puppet children': a report of three cases. *Dev. Med. Child Neurol.* **7**:681-683.
- Antequera, F. and A. Bird.** 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:11995-11999.
- Aoki, A., I. Suetake, J. Miyagawa, T. Fujio, T. Chijiwa, H. Sasaki, and S. Tajima.** 2001. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **29**:3506-3512.
- Barr, M. L. and E. G. Bertram.** 1949. A morphological distinction between neurons of the male and female and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* **163**:676-677.
- Bauer-Hofmann, R., C. Borghouts, E. Auvinen, E. Bourda, F. Rosl, and A. Alonso.** 1996. Genomic cloning and characterization of the nonoccupied allele corresponding to the integration site of human papillomavirus type 16 DNA in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology* **217**:33-41.
- Baylin, S. B. and J. G. Herman.** 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* **16**:168-174.
- Bestor, T., A. Laudano, R. Mattaliano, and V. Ingram.** 1988. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **203**:971-983.
- Blackwell, T. K. and A. K. Walker.** 2002. Getting the right dose of repression. *Genes Dev.* **16**:769-772.
- Borsani, G., R. Tonlorenzi, M. C. Simmler, L. Dandolo, D. Arnaud, V. Capra, M. Grompe, A. Pizzuti, D. Muzny, C. Lawrence, and .** 1991. Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* **351**:325-329.
- Bourc'his, D., G. L. Xu, C. S. Lin, B. Bollman, and T. H. Bestor.** 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**:2536-2539.
- Boyd, V. L. and G. Zon.** 2004. Bisulfite conversion of genomic DNA for methylation analysis: protocol simplification with higher recovery applicable to limited samples and increased throughput. *Anal. Biochem.* **326**:278-280.
- Boyes, J. and A. Bird.** 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* **64**:1123-1134.

- Boyes, J. and G. Felsenfeld.** 1996. Tissue-specific factors additively increase the probability of the all-or-none formation of a hypersensitive site. *EMBO J.* **15**:2496-2507.
- Brenner, C. and F. Fuks.** 2006. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **301**:45-66.
- Brockdorff, N., A. Ashworth, G. F. Kay, P. Cooper, S. Smith, V. M. McCabe, D. P. Norris, G. D. Penny, D. Patel, and S. Rastan.** 1991. Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. *Nature* **351**:329-331.
- Brockdorff, N., A. Ashworth, G. F. Kay, V. M. McCabe, D. P. Norris, P. J. Cooper, S. Swift, and S. Rastan.** 1992. The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* **71**:515-526.
- Brown, C. J., A. Ballabio, J. L. Rupert, R. G. Lafreniere, M. Grompe, R. Tonlorenzi, and H. F. Willard.** 1991. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* **349**:38-44.
- Brown, S. W.** 1966. Heterochromatin. *Science* **151**:417-425.
- Buiting, K., S. Saitoh, S. Gross, B. Dittrich, S. Schwartz, R. D. Nicholls, and B. Horsthemke.** 1995. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat. Genet.* **9**:395-400.
- Burlingham, B. T. and W. Doerfler.** 1971. Three size-classes of intracellular adenovirus deoxyribonucleic acid. *J. Virol.* **7**:707-719.
- Cereseto, A. and M. Giacca.** 2004. Integration site selection by retroviruses. *AIDS Rev.* **6**:13-21.
- Chadwick, B. P. and H. F. Willard.** 2003. Barring gene expression after XIST: maintaining facultative heterochromatin on the inactive X. *Semin. Cell Dev. Biol.* **14**:359-367.
- Chedin, F., M. R. Lieber, and C. L. Hsieh.** 2002. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:16916-16921.
- Chen, T., Y. Ueda, J. E. Dodge, Z. Wang, and E. Li.** 2003. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell Biol.* **23**:5594-5605.
- Cheng, C. W., P. E. Wu, J. C. Yu, C. S. Huang, C. T. Yue, C. W. Wu, and C. Y. Shen.** 2001. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* **20**:3814-3823.
- Church, G. M. and W. Gilbert.** 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**:1991-1995.
- Clark, S. J., J. Harrison, C. L. Paul, and M. Frommer.** 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* **22**:2990-2997.

- Clemson, C. M., J. A. McNeil, H. F. Willard, and J. B. Lawrence.** 1996. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* **132**:259-275.
- Deininger, P. L., J. V. Moran, M. A. Batzer, and H. H. Kazazian, Jr.** 2003. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**:651-658.
- Doerfler, W.** 1981. DNA methylation--a regulatory signal in eukaryotic gene expression. *J. Gen. Virol.* **57**:1-20.
- Doerfler, W.** 1983. DNA methylation and gene activity. *Annu. Rev. Biochem.* **52**:93-124.
- Doerfler, W., R. Gahlmann, S. Stabel, R. Deuring, U. Lichtenberg, M. Schulz, D. Eick, and R. Leisten.** 1984. On the mechanism of recombination between adenoviral and cellular DNAs: the structure of junction sites. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**:193-228.
- Eberharter, A. and P. B. Becker.** 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**:224-229.
- Ehrlich, M.** 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**:5400-5413.
- Ehrlich, M.** 2006. Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **310**:251-274.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, L. H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune, and C. Gehrke.** 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* **10**:2709-2721.
- Eick, D. and W. Doerfler.** 1982. Integrated adenovirus type 12 DNA in the transformed hamster cell line T637: sequence arrangements at the termini of viral DNA and mode of amplification. *J. Virol.* **42**:317-321.
- Eick, D., B. Kemper, and W. Doerfler.** 1983. Excision of amplified viral DNA at palindromic sequences from the adenovirus type 12-transformed hamster cell line T637. *EMBO J.* **2**:1981-1986.
- Fang, J., Q. Feng, C. S. Ketel, H. Wang, R. Cao, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. A. Simon, and Y. Zhang.** 2002. Purification and functional characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase. *Curr. Biol.* **12**:1086-1099.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein.** 1983a. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**:89-92.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein.** 1983b. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**:47-54.
- Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, and C. L. Paul.** 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive

- display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:1827-1831.
- Gahlmann, R., R. Leisten, L. Vardimon, and W. Doerfler.** 1982. Patch homologies and the integration of adenovirus DNA in mammalian cells. *EMBO J.* **1**:1101-1104.
- Gahlmann, R., S. Stabel, R. Deuring, and W. Doerfler.** 1984. [Recombination between adenoviral and cellular DNA]. *Vopr. Virusol.* **29**:399-410.
- Gama-Sosa, M. A., V. A. Slagel, R. W. Trewyn, R. Oxenhandler, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, and M. Ehrlich.** 1983. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* **11**:6883-6894.
- Glenn, C. C., R. D. Nicholls, W. P. Robinson, S. Saitoh, N. Niikawa, A. Schinzel, B. Horsthemke, and D. J. Driscoll.** 1993. Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum. Mol. Genet.* **2**:1377-1382.
- Groneberg, J., Y. Chardonnet, and W. Doerfler.** 1977. Integrated viral sequences in adenovirus type 12-transformed hamster cells. *Cell* **10**:101-111.
- Groneberg, J., D. Sutter, H. Soboll, and W. Doerfler.** 1978. Morphological revertants of adenovirus type 12-transformed hamster cells. *J. Gen. Virol.* **40**:635-645.
- Gunthert, U., M. Schweiger, M. Stupp, and W. Doerfler.** 1976. DNA methylation in adenovirus, adenovirus-transformed cells, and host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **73**:3923-3927.
- Haaf, T.** 2001. The battle of the sexes after fertilization: behaviour of paternal and maternal chromosomes in the early mammalian embryo. *Chromosome. Res.* **9**:263-271.
- Haaf, T.** 2006. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **310**:13-22.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Harrison, J., C. Stirzaker, and S. J. Clark.** 1998. Cytosines adjacent to methylated CpG sites can be partially resistant to conversion in genomic bisulfite sequencing leading to methylation artifacts. *Anal. Biochem.* **264**:129-132.
- Hata, K., M. Okano, H. Lei, and E. Li.** 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**:1983-1993.
- Hayatsu, H., Y. Wataya, and K. Kazushige.** 1970. The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. *J. Am. Chem. Soc.* **92**:724-726.
- Heard, E.** 2005. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**:482-489.
- Hebbes, T. R., A. W. Thorne, and C. Crane-Robinson.** 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**:1395-1402.

- Heller, H., C. Kammer, P. Wilgenbus, and W. Doerfler.** 1995. Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage lambda) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:5515-5519.
- Hermann, A., S. Schmitt, and A. Jeltsch.** 2003. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **278**:31717-31721.
- Hertz, J. M., G. Schell, and W. Doerfler.** 1999. Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **274**:24232-24240.
- Hochstein, N., I. Muiznieks, L. Mangel, H. Brondke, and W. Doerfler.** 2007. The Epigenetic Status of an Adenovirus Transgenome upon Long-term Cultivation in Hamster Cells. Submitted.
- Holliday, R. and J. E. Pugh.** 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**:226-232.
- Hotchkiss, R. D.** 1948. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* **175**:315-332.
- Hsieh, C. L.** 1999. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol. Cell Biol.* **19**:8211-8218.
- Itano, O., M. Ueda, K. Kikuchi, O. Hashimoto, S. Hayatsu, M. Kawaguchi, H. Seki, K. Aiura, and M. Kitajima.** 2002. Correlation of postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma with demethylation of repetitive sequences. *Oncogene* **21**:789-797.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis.** 2001. Translating the histone code. *Science* **293**:1074-1080.
- Johnson, T. B. and R. D. Coghill.** 1928. Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methyl-cytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus. *J. Am. Chem. Soc.* **47**:2838-2844.
- Jordan, I. K., I. B. Rogozin, G. V. Glazko, and E. V. Koonin.** 2003. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet.* **19**:68-72.
- Jox, A., C. Rohen, G. Belge, S. Bartnitzke, M. Pawlita, V. Diehl, J. Bullerdiek, and J. Wolf.** 1997. Integration of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma cells leads to a region of enhanced chromosome instability. *Ann. Oncol.* **8 Suppl 2**:131-135.
- Kaiser, A. D. and D. S. Hogness.** 1960. The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J. Mol. Biol.* **2**:392-415.
- Kammer, C. and W. Doerfler.** 1995. Genomic sequencing reveals absence of DNA methylation in the major late promoter of adenovirus type 2 DNA in the virion and in productively infected cells. *FEBS Lett.* **362**:301-305.
- Kaneda, A., T. Tsukamoto, T. Takamura-Enya, N. Watanabe, M. Kaminishi, T. Sugimura, M. Tatematsu, and T. Ushijima.** 2004a. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci.* **95**:58-64.

- Kaneda, M., M. Okano, K. Hata, T. Sado, N. Tsujimoto, E. Li, and H. Sasaki.** 2004b. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**:900-903.
- Klose, R. J. and A. P. Bird.** 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* **31**:89-97.
- Knoblauch, M., J. Schroer, B. Schmitz, and W. Doerfler.** 1996. The structure of adenovirus type 12 DNA integration sites in the hamster cell genome. *J. Virol.* **70**:3788-3796.
- Koetsier, P. A., J. Schorr, and W. Doerfler.** 1993. A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA. *Biotechniques* **15**:260-262.
- Kunert, N., J. Marhold, J. Stanke, D. Stach, and F. Lyko.** 2003. A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* **130**:5083-5090.
- Lachner, M., R. J. O'Sullivan, and T. Jenuwein.** 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.* **116**:2117-2124.
- Laird, P. W.** 2003. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* **3**:253-266.
- Lamartina, S., E. Sporeno, E. Fattori, and C. Toniatti.** 2000. Characteristics of the adeno-associated virus preintegration site in human chromosome 19: open chromatin conformation and transcription-competent environment. *J. Virol.* **74**:7671-7677.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, and others.** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**:860-921.
- Langner, K. D., L. Vardimon, D. Renz, and W. Doerfler.** 1984. DNA methylation of three 5' C-C-G-G 3' sites in the promoter and 5' region inactivate the E2a gene of adenovirus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**:2950-2954.
- Ledbetter, D. H., V. M. Riccardi, S. D. Airhart, R. J. Strobel, B. S. Keenan, and J. D. Crawford.** 1981. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N. Engl. J. Med.* **304**:325-329.
- Lee, S. H., M. Oshige, S. T. Durant, K. K. Rasila, E. A. Williamson, H. Ramsey, L. Kwan, J. A. Nickoloff, and R. Hromas.** 2005. The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:18075-18080.
- Lei, H., S. P. Oh, M. Okano, R. Juttermann, K. A. Goss, R. Jaenisch, and E. Li.** 1996. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* **122**:3195-3205.
- Leonhardt, H., A. W. Page, H. U. Weier, and T. H. Bestor.** 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**:865-873.

- Li, E., T. H. Bestor, and R. Jaenisch.** 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**:915-926.
- Liu, K., Y. F. Wang, C. Cantemir, and M. T. Muller.** 2003. Endogenous assays of DNA methyltransferases: Evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Mol. Cell Biol.* **23**:2709-2719.
- Lucchesi, J. C. and J. E. Manning.** 1987. Gene dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* **24**:371-429.
- Lyko, F., B. H. Ramsahoye, H. Kashevsky, M. Tudor, M. A. Mastrangelo, T. L. Orr-Weaver, and R. Jaenisch.** 1999. Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. *Nat. Genet.* **23**:363-366.
- Lyon, M. F.** 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**:372-373.
- Manders, E. M., A. E. Visser, A. Koppen, W. C. de Leeuw, L. R. van, G. J. Brakenhoff, and D. R. van.** 2003. Four-dimensional imaging of chromatin dynamics during the assembly of the interphase nucleus. *Chromosome. Res.* **11**:537-547.
- Matzke, M. A., M. F. Mette, and A. J. Matzke.** 2000. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.* **43**:401-415.
- Mayer, W., A. Niveleau, J. Walter, R. Fundele, and T. Haaf.** 2000a. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**:501-502.
- Mayer, W., A. Smith, R. Fundele, and T. Haaf.** 2000b. Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J. Cell Biol.* **148**:629-634.
- Meller, V. H. and M. I. Kuroda.** 2002. Sex and the single chromosome. *Adv. Genet.* **46**:1-24.
- Meyer, B. J. and L. P. Casson.** 1986. *Caenorhabditis elegans* compensates for the difference in X chromosome dosage between the sexes by regulating transcript levels. *Cell* **47**:871-881.
- Muller, K., H. Heller, and W. Doerfler.** 2001. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J. Biol. Chem.* **276**:14271-14278.
- Nakamura, T. M., B. A. Moser, L. L. Du, and P. Russell.** 2005. Cooperative control of Crb2 by ATM family and Cdc2 kinases is essential for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* **25**:10721-10730.
- Nicholls, R. D.** 1994. New insights reveal complex mechanisms involved in genomic imprinting. *Am. J. Hum. Genet.* **54**:733-740.
- Nicholls, R. D., J. H. Knoll, M. G. Butler, S. Karam, and M. Lalande.** 1989. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* **342**:281-285.

- Nishioka, K., J. C. Rice, K. Sarma, H. Erdjument-Bromage, J. Werner, Y. Wang, S. Chuikov, P. Valenzuela, P. Tempst, R. Steward, J. T. Lis, C. D. Allis, and D. Reinberg.** 2002. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell* **9**:1201-1213.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber, and E. Li.** 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**:247-257.
- Okano, M., S. Xie, and E. Li.** 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19**:219-220.
- Orend, G., M. Knoblauch, and W. Doerfler.** 1995. Selective loss of unmethylated segments of integrated Ad12 genomes in revertants of the adenovirus type 12-transformed cell line T637. *Virus Res.* **38**:261-267.
- Ortin, J., K. H. Scheidtmann, R. Greenberg, M. Westphal, and W. Doerfler.** 1976. Transcription of the genome of adenovirus type 12. III. Maps of stable RNA from productively infected human cells and abortively infected and transformed hamster cells. *J. Virol.* **20**:355-372.
- Prader, A., A. Labhart, and H. Willi.** 1956. Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz. Med. Wochenschrift* **86**:1260-1261.
- Pradhan, S., A. Bacolla, R. D. Wells, and R. J. Roberts.** 1999. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* **274**:33002-33010.
- Prak, E. T. and H. H. Kazazian.** 2000. Mobile elements and the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **1**:134-144.
- Ramsahoye, B. H., D. Biniszkiwicz, F. Lyko, V. Clark, A. P. Bird, and R. Jaenisch.** 2000. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:5237-5242.
- Razin, A., C. Webb, M. Szyf, J. Yisraeli, A. Rosenthal, T. Naveh-Many, N. Sciaky-Gallili, and H. Cedar.** 1984. Variations in DNA methylation during mouse cell differentiation in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**:2275-2279.
- Recillas-Targa, F.** 2002. DNA methylation, chromatin boundaries, and mechanisms of genomic imprinting. *Arch. Med. Res.* **33**:428-438.
- Remus, R., C. Kammer, H. Heller, B. Schmitz, G. Schell, and W. Doerfler.** 1999. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *J. Virol.* **73**:1010-1022.
- Rhee, I., K. E. Bachman, B. H. Park, K. W. Jair, R. W. Yen, K. E. Schuebel, H. Cui, A. P. Feinberg, C. Lengauer, K. W. Kinzler, S. B. Baylin, and B. Vogelstein.** 2002. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* **416**:552-556.

- Rhee, I., K. W. Jair, R. W. Yen, C. Lengauer, J. G. Herman, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, S. B. Baylin, and K. E. Schuebel.** 2000. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* **404**:1003-1007.
- Rice, J. C., K. Nishioka, K. Sarma, R. Steward, D. Reinberg, and C. D. Allis.** 2002. Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev.* **16**:2225-2230.
- Riggs, A. D.** 1975. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* **14**:9-25.
- Robert, M. F., S. Morin, N. Beaulieu, F. Gauthier, I. C. Chute, A. Barsalou, and A. R. MacLeod.** 2003. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat. Genet.* **33**:61-65.
- Robinson, W. P., A. Bottani, Y. G. Xie, J. Balakrishnan, F. Binkert, M. Machler, A. Prader, and A. Schinzel.** 1991. Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* **49**:1219-1234.
- Rosl, F., E. M. Westphal, and H. H. zur.** 1989. Chromatin structure and transcriptional regulation of human papillomavirus type 18 DNA in HeLa cells. *Mol. Carcinog.* **2**:72-80.
- Roth, S. Y., J. M. Denu, and C. D. Allis.** 2001. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:81-120.
- Russell, L. B.** 1963. Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and region of origin. *Science* **140**:976-978.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1350-1354.
- Sanders, S. L., M. Portoso, J. Mata, J. Bahler, R. C. Allshire, and T. Kouzarides.** 2004. Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**:603-614.
- Sandmeyer, S. B., L. J. Hansen, and D. L. Chalker.** 1990. Integration specificity of retrotransposons and retroviruses. *Annu. Rev. Genet.* **24**:491-518.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:5463-5467.
- Sarg, B., W. Helliger, H. Talasz, E. Koutzamani, and H. H. Lindner.** 2004. Histone H4 hyperacetylation precludes histone H4 lysine 20 trimethylation. *J. Biol. Chem.* **279**:53458-53464.
- Schirm, S. and W. Doerfler.** 1981. Expression of viral DNA in adenovirus type 12-transformed cells, in tumor cells, and in revertants. *J. Virol.* **39**:694-702.
- Schreiber, S. L. and B. E. Bernstein.** 2002. Signaling network model of chromatin. *Cell* **111**:771-778.

- Schroer, J., I. Holker, and W. Doerfler.** 1997. Adenovirus type 12 DNA firmly associates with mammalian chromosomes early after virus infection or after DNA transfer by the addition of DNA to the cell culture medium. *J. Virol.* **71**:7923-7932.
- Schulz, M., U. Freisem-Rabien, R. Jessberger, and W. Doerfler.** 1987. Transcriptional activities of mammalian genomes at sites of recombination with foreign DNA. *J. Virol.* **61**:344-353.
- Shapiro, R. and J. M. Weisgras.** 1970. Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**:839-843.
- Smith, K.** 2001. Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA. *Reprod. Nutr. Dev.* **41**:465-485.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Sprengel, J., B. Schmitz, D. Heuss-Neitzel, C. Zock, and W. Doerfler.** 1994. Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis. *J. Virol.* **68**:379-389.
- Stabel, S., W. Doerfler, and R. R. Friis.** 1980. Integration sites of adenovirus type 12 DNA in transformed hamster cells and hamster tumor cells. *J. Virol.* **36**:22-40.
- Stoker, M. and I. MacPherson.** 1964. Syrian Hamster Fibroblast Cell Line BHK21 and its Derivatives. *Nature* **203**:1355-1357.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis.** 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**:41-45.
- Strohl, W. A., A. S. Rabson, and H. Rouse.** 1967. Adenovirus tumorigenesis: role of the viral genome in determining tumor morphology. *Science* **156**:1631-1633.
- Sutcliffe, J. S., M. Nakao, S. Christian, K. H. Orstavik, N. Tommerup, D. H. Ledbetter, and A. L. Beaudet.** 1994. Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat. Genet.* **8**:52-58.
- Sutter, D. and W. Doerfler.** 1980. Methylation of integrated viral DNA sequences in hamster cells transformed by adenovirus 12. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **44 Pt 1**,565-568.
- Sutter, D., M. Westphal, and W. Doerfler.** 1978. Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12-transformed hamster cells. *Cell* **14**:569-585.
- Takata, M., M. S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, and S. Takeda.** 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **17**:5497-5508.

- Tang, L. Y., M. N. Reddy, V. Rasheva, T. L. Lee, M. J. Lin, M. S. Hung, and C. K. Shen.** 2003. The eukaryotic DNMT2 genes encode a new class of cytosine-5 DNA methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **278**:33613-33616.
- Tolun, A., P. Alestrom, and U. Pettersson.** 1979. Sequence of inverted terminal repetitions from different adenoviruses: demonstration of conserved sequences and homology between SA7 termini and SV40 DNA. *Cell* **17**:705-713.
- Tsyba, L., A. V. Rynditch, E. Boeri, K. Jabbari, and G. Bernardi.** 2004. Distribution of HIV-1 in the genomes of AIDS patients. *Cell Mol. Life Sci.* **61**:721-726.
- Turek-Plewa, J. and P. P. Jagodzinski.** 2005. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol. Biol. Lett.* **10**:631-647.
- Turner, B. M.** 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**:285-291.
- Vardimon, L., A. Kressmann, H. Cedar, M. Maechler, and W. Doerfler.** 1982. Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **79**:1073-1077.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, and others.** 2001. The sequence of the human genome. *Science* **291**:1304-1351.
- Waalwijk, C. and R. A. Flavell.** 1978. MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites. *Nucleic Acids Res.* **5**:3231-3236.
- Wang, R. Y., C. W. Gehrke, and M. Ehrlich.** 1980. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res.* **8**:4777-4790.
- Warnecke, P. M., C. Stirzaker, J. R. Melki, D. S. Millar, C. L. Paul, and S. J. Clark.** 1997. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res.* **25**:4422-4426.
- Watt, F. and P. L. Molloy.** 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* **2**:1136-1143.
- Weiner, A. M.** 2002. SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:343-350.
- Wolffe, A. P. and M. A. Matzke.** 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**:481-486.
- Wronka, G., K. Fichteler, B. Schmitz, and W. Doerfler.** 2002. Integrative recombination between adenovirus type 12 DNA and mammalian DNA in a cell-free system: joining by short sequence homologies. *Virus Res.* **90**:225-242.
- Wurtele, H., K. C. Little, and P. Chartrand.** 2003. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther.* **10**:1791-1799.

- Xie, S., Z. Wang, M. Okano, M. Nogami, Y. Li, W. W. He, K. Okumura, and E. Li.** 1999. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* **236**:87-95.
- Yoder, J. A. and T. H. Bestor.** 1998. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum. Mol. Genet.* **7**:279-284.
- Yoder, J. A., N. S. Soman, G. L. Verdine, and T. H. Bestor.** 1997a. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J. Mol. Biol.* **270**:385-395.
- Yoder, J. A., C. P. Walsh, and T. H. Bestor.** 1997b. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**:335-340.
- Zhu, X., I. Leav, Y. K. Leung, M. Wu, Q. Liu, Y. Gao, J. E. McNeal, and S. M. Ho.** 2004. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am. J. Pathol.* **164**:2003-2012.

J. Anhang

Folgendes Projekt wurde mit den unten aufgeführten Autoren durchgeführt.

Mein experimenteller Beitrag war:

- Plaque-Tests zur Virus-Titration (ohne Abbildung)
- FACS-Analysen zur hCAR-Oberflächenexpression (Abbildung 1)
- Immunfluoreszenz-Färbungen von Ad12-infizierten BHK-hCAR-Zellen (Abbildung 2)
- Beobachtungen zum zytopathischen Effekt (Abbildung 3)
- ³H-Thymidin-Markierungen zur Detektion von neusynthetisierten Viruspartikeln bzw. von neugebildeter Virus-DNA nach Ad12-Infektion (Abbildungen 4 und 6)
- qPCR-Analysen zur Virus-DNA-Aufnahme in den Zellkern (Abbildung 5).

J.1. hCAR-enhanced Entry of Adenovirus Type 12 (Ad12) into Non-permissive Hamster Cells Proves a Necessary but not Sufficient Precondition for Viral Replication

Dennis Webb,^{*1,4} Norbert Hochstein,^{*2} Marianna Hösel,^{*1,4} Andreas Dorn,^{2,5} Werner Seidel,³ Sabrina Auerochs,² and Walter Doerfler^{1,2,6}

*Have contributed equally to this manuscript.

¹Institute of Genetics, University of Cologne, Zùlpicher Str. 47, D-50674 Cologne, Germany

²Institute for Clinical and Molecular Virology, Erlangen University, Schlossgarten 4, D-91054 Erlangen, Germany

³Friedrich Loeffler Institute of Medical Microbiology, University of Greifswald, Lutherstr. 6, D-17487 Greifswald, Germany

⁴Present address: Department of Molecular Infectiology at the Center for Molecular Medicine, University of Cologne, D-50931 Cologne, Germany

⁵Present address: Invitrogen, Emmy-Noether-Str. 10, D-76131 Karlsruhe, Germany

Running title: hCAR-transgenic hamster cells remain non-permissive for Ad12

Abstract

In contrast to human adenovirus type 2 (Ad2), the inoculation of baby hamster kidney (BHK21) cells with Ad12 is abortive. Ad12 is highly oncogenic in newborn Syrian hamsters, Ad2 is not. The stringent non-permissiveness of hamster cells for Ad12 is one of the preconditions for Ad12 oncogenicity. We have therefore studied the nature of the abortive interaction of Ad12 with hamster cells. In permissive human cells, all viral genes are transcribed in a specific temporal progression. In hamster cells, however, only some of the early Ad12 genes are activated. The amount of Ad12 DNA imported into the nuclei of abortively infected hamster cells is < 1% of that in permissive human HeLa cells. Starting at 24 h p.i. with Ad12, only BHK21 cells transfected with or transgenic for and constitutively expressing the human Coxsackie-Adenovirus receptor (hCAR) gene (hCAR•BHK21) develop a distinct and progressive cytopathic effect. Ad12 efficiently adsorbs to hCAR•BHK21 cells. Uptake and nuclear transport of Ad12 DNA in the hCAR-complemented BHK21 cells is equal to or even higher than in permissive human HeLa cells. However, the expression of the hCAR gene in Ad12-infected BHK21 cells fails to facilitate the replication of Ad12 DNA in the complemented cells. Transcription levels of the early Ad12 E1A and pTP genes are markedly higher than in non-transgenic Ad12-infected BHK21. Metabolic labeling of Ad12-infected hCAR•BHK cells with ³H-thymidine followed by equilibrium sedimentation in CsCl density gradients does not reveal infectious Ad12 virions at the authentic buoyant density stratum. In spite of the intranuclear presence of Ad12 DNA in hCAR-transgenic BHK21 cells in amounts comparable to those in Ad12-infected permissive human cells, the complemented system remains unable to support Ad12 replication. In contrast to Ad2, Ad12 has never been able to adapt to the non-permissive hamster cell milieu.

Introduction

Although Syrian hamster cells support a full replication cycle with Ad2, their interaction with human adenovirus type 12 (Ad12) is completely abortive (Doerfler, 1969; 1991; Hosel et al., 2003). The course of Ad12 infection in non-permissive hamster cells has been investigated for two closely related reasons: (i) Ad12 induces tumors in newborn Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), and studies on this virus-host system may help understand the events leading to viral oncogenesis (Hohlweg et al., 2003; 2004). (ii) In the hamster host, Ad12 converts from a cell-killing pathogen in human cells to an oncogenic virus in newborn hamster. The abortiveness of Ad12 in hamster cells is precondition to facilitate the oncogenic transformation process. Productive adenovirus infection of hamster cells, as with Ad2, would kill all the cells and leave no chance for tumor development. The Ad12-hamster cell interaction thus provides yet another example of fundamental alterations in viral pathobiology upon the crossing of species barriers from human to hamster. There are prominent cases of “evolving” viruses which have managed to overcome such barriers and develop into dangerous pathogens for humans, e.g. HIV, SARS Corona virus, or avian influenza virus H1N1 in 1918.

Adenoviruses enter cells by receptor-mediated endocytosis (Lonberg-Holm and Philipson, 1969; Nemerow and Stewart, 1999) followed by virus escape into the cytosol. Adenoviruses share the binding receptor with coxsackieviruses, the Coxsackie-Adenovirus receptor (CAR) (Bergelson et al., 1997; Philipson and Pettersson, 2004). The C-terminal trimeric knob of the adenoviral fiber protein interacts directly with the CAR receptor (Xia et al., 1994). The receptor is expressed in many commonly used cell lines. Its biological function is poorly understood and may be in the regulation of cell proliferation and/or differentiation (Pickles et al., 1998; Walters et al., 2001) as well as in cell-cell adhesion. Within 2 h after infection, the virus undergoes stepwise disassembly, docks at the nuclear pore complex followed by the translocation of adenoviral DNA into the nucleoplasm (Lonberg-Holm and Philipson, 1969; Morgan et al., 1969; Whittaker et al., 2000), where viral DNA replication, transcription and virion assembly proceed (Russell and Kemp, 1995; Greber et al., 1997; Whittaker et al., 2000; Greber and Fassati, 2003). At the same time, a complex and hitherto less well studied re-programming of cellular gene transcription parallels viral gene expression in infected cells (Zhao et al., 2003; Dorn et al., 2005; Granberg et al., 2006).

We have studied Ad12 adsorption, nuclear uptake of viral DNA, viral gene transcription and DNA replication in permissive human, in non-permissive and in hCAR-transfected or hCAR-

transgenic BHK21 hamster cells. In contrast to abortively Ad12-infected BHK21 cells with very limited uptake of Ad12 DNA, expression of the hCAR gene in BHK21 hamster cells permits efficient virus import, the transfer of Ad12 DNA into BHK21 cell nuclei at levels comparable to those in permissive human cells, but not Ad12 DNA replication. Assembly of infectious Ad12 virions cannot be detected in hCAR-transgenic BHK21 cells.

Materials and Methods

Standard techniques

The BHK21 cell line transgenic for the hCAR gene (BHK-hCAR cells, Sirena et al., 2004) was a gift of Silvio Hemmi and Urs Greber, Zürich University, Switzerland. The methods for the propagation of human HeLa or A549 lung cancer cells as well as for BHK21 hamster cells were described earlier (Hosel et al., 2001). Procedures for Ad12 replication on human HeLa cells and Ad12 purification were reported previously (Doerfler, 1969). Methods for the infection of cells with Ad12 were outlined elsewhere (Hosel et al., 2001; 2003). Ad12 was plaque titrated on human A549 cells by standard protocols (Lundholm and Doerfler, 1971). When the infectivity of extracts from Ad12-infected hCAR-transgenic BHK21 cells was assessed, monolayers of human HeLa were used.

Cloning of the hCAR in the pEGFP-C1 expression vector

The 1114-bp fragment corresponding to the human CAR gene was amplified by PCR with the following primers containing sequences for the NheI and BamHI restriction sites which are underlined.

NheI-CAR-FW: 5'-GAA GCT AGC ATG GCG CTC CTG CTG TGC-3'

BamHI-CAR-RW: 5'-AAA GGA TCC CTA TAC TAT AGA CCC ATC-3'.

The PCR fragments were cloned into the NheI and BamHI sites of the expression vector pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA). In this vector, the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene was under the control of the human cytomegalovirus (HCMV) promoter. Restriction with NheI and BamHI led to the excision of the EGFP gene thus avoiding the generation of a fusion protein with GFP.

For the transfection of the hCAR expression vector into BHK21 cells, amaxa's nucleofection method (amaxa GmbH, Cologne, Germany) was applied following the manufacturer's protocol. Control transfections with the pEGFP-C1 vector revealed ~75% GFP-expressing cells at 18h after transfection. For the analyses of Ad12 mRNA synthesis in hCAR-transfected BHK21 cells with the LightCycler method or with single-stranded DNA arrays, the hCAR construct or the pEGFP-C1 vector was transfected as follows: BHK21 cells were grown to 80-90% confluence on monolayer cultures. About 2×10^6 cells were suspended in 0.5 ml of RPMI medium without glutamine or dye (Invitrogen, Paisley, UK). Subsequently, 10 μ g of hCAR expression vector and 3 μ g of the pEGFP-C1 vector were added, and cells were electroporated in 4-mm-diameter cuvettes with a Bio-Rad gene pulser at 300V and 960 μ F. At

24 h after electroporation, cells were examined for the expression of GFP and then inoculated with 30 plaque forming units (pfu) of Ad12 per cell. About 60 % of the transfected cells expressed GFP.

Construction and use of single-stranded DNA arrays

Ad12-specific DNA segments corresponding to 28 different ORFs of Ad12 DNA were amplified by PCR using appropriate primers and cloned into M13mp18 vector DNA as described (Hosel et al., 2001). Single-stranded (ss) M13-Ad12 DNAs were prepared from 28 different clones by using the ss-M13-DNA purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The ssDNAs were denatured in 0.4 M NaOH, 5 mM EDTA, fixed on positively charged nylon membranes (Roche, Basel, Switzerland), and hybridized to ³²P-labeled cDNA. Amounts of 20 ng or 100 ng of Ad12-M13 DNA were used for HeLa•Ad12, BHK21•Ad12 or for hCAR-transfected BHK21•Ad12 DNA array analyses, respectively (see Fig.7). For reverse transcription and ³²P-labeling of cDNA, total RNA from mock- or Ad12-infected cells was isolated by using a Macherey/Nagel kit (Düren, Germany). In this reaction 5 µg of RNA, 2 µg of oligo (dT) 12-18 primers, and 1 mM of each of the dNTPs were denatured at 65 °C for 5 min, chilled on ice, then mixed with 5 µCi of (α-³²P)-dCTP (3.000 µCi/mmol), 10 mM DTT, superscript II reaction buffer, and 300 units of superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and incubated at 42 °C for 1.5 h. Subsequently, the ³²P-labeled probes were purified by gel filtration on Sephadex G-50 columns (Roche) and hybridized to DNA arrays on membranes at 42 °C for 20 h in DIG hybridization buffer (Roche). Membranes were washed 3 times for 20 min in 0.5× SSC, 1% SDS at 65 °C and exposed for 14 h (HeLa•Ad12) or 48 h (BHK21•Ad12, hCAR-transfected BHK21•Ad12) to X-ray films.

Fluorescence-activated cell sorting

For the detection of hCAR expression, 5×10⁵ cells were grown in exponential phase to 70-80% confluence and were then incubated on ice for 30 min in 100 µl FACS buffer (5% fetal calf serum, 0.01% sodium azide in PBS-d) with a monoclonal IgG₁ anti-CAR antibody (Upstate, Lake Placid, NY, USA, cat# 05-644) followed by a 30-min incubation in the dark with phycoerythrin-conjugated antibody to mouse IgG (Abcam, Cambridge, UK, cat# ab7002). Cells were then pelleted and washed with FACS buffer and resuspended in 400 µl PBS-d/1% paraformaldehyde. Isotype-matched immunoglobulins and the FACS procedure without the first antibody step were used as controls. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Immunofluorescence cell staining

HeLa, BHK21 cells or hCAR-transfected or hCAR-transgenic BHK21 cells were grown to 40-50% confluence on sterile glass cover slips in 6 cm diameter dishes. Cells were then cooled to 4°C for 30 minutes and inoculated with Ad12. Virus was allowed to adsorb for 30 min, and the cells were then shifted to 37°C. At different times thereafter, cells were fixed for 15 min in 2% paraformaldehyde in PBS-d, followed by incubation in 0.1 M glycine for 10 min and in 0.1% TritonX-100 for 15 min. Subsequently, cells were treated for 30 min with blocking solution (2% BSA and 0.05% Tween20 in PBS), followed by staining for 30 min in appropriate dilutions of each the first (rabbit anti Ad12 protein IX) and second (Alexa 488nm goat anti rabbit, Molecular Probes, Leiden, Netherlands) antibodies in blocking solution. After each step, cells were washed three times with PBS. After a final extensive wash in PBS, cells were sealed with nail polish on glass slides in DABCO (0.2 M 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octane, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 90 % glycerol) containing 20 nM propidium iodide. Fluorescence microscopy was performed and pictures were taken with confocal Zeiss laser scan microscopes (LSM4 or LSM5).

Quantitation of Ad12 DNA in infected human and hamster cells

HeLa, BHK21, BHK-hCAR or hCAR-transfected BHK21 cells were inoculated with either Ad2 or Ad12 at 4°C in medium with serum. At time intervals after shifting the infected cells to 37°C, cells were counted, washed twice in PBS-d, and 2 ml of ice cold nuclear extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5% (v/v), Igepal CA 630) were added. After incubation for 5 min on ice and centrifugation at 4°C and 400 ×g, the nuclear pellet was washed once in 5 ml of ice cold PBS, followed by an overnight incubation with 1 ml proteinase K buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 mM NaCl) plus 100 µl of proteinase K at 10 mg/ml. The DNA was then purified by repeated phenol-chloroform extractions and, after RNase treatment, 100 ng of nuclear DNA were used for quantitative PCR with either the Sybr Green LightCycler Kit in a Roche LightCycler or with 2× qPCR Sybr Green-Mastermix from Qiagen in an Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System. PCR primers were selected for a 536 bp fragment within the E1A region of Ad2 or Ad12 or for a 78 bp fragment within the MLP region of Ad12.

Ad12 E1A primers:

P1: 5'-CCT TGG TCC TGT CGT ATC AGG AAG CTG ACG-3'

P2: 5'-TGT TGT AGG CTC GCA GAT AGC ACA AAG AGC-3'

Ad2 E1A primers:

P1: 5'-GAG ACA TAT TAT CTG CCA CGG AGG-3'

P2: 5'-CCA CAG GTC CTC ATA TAG CAA AGC-3'

Ad12 MLP primers:

P1: 5'-CCG CGG TCC TCC TCG TA-3'

P2: 5'-TGT GGC TTC CTT TGT ACT TGC TT-3'

Temperature cycling was as follows: 94°C for 15 min for the de-blocking of Taq DNA polymerase; 40 cycles at 94°C for 2 sec, 60°C for 6 sec and 72°C for 30 sec (LightCycler approach) and 95°C for 15 min; or 45 cycles at 94°C for 15 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec (Qiagen approach). Each qPCR was followed by a melting curve analysis to ascertain specificity of the PCR products. Quantifications were analyzed by the device-specific software, and PCR products were directly visualized by electrophoretic separation on agarose gels.

Metabolic labeling of newly synthesized DNA

with ³H-thymidine in hCAR-transfected or -transgenic BHK21 cells

BHK-hCAR or hCAR-transfected BHK21 cells were inoculated with Ad12 at an moi of 200, and at 6 h p.i., ³H-thymidine (35 µCi/ml) was added to the medium. At 80 h p.i., about 5×10⁵ cells in 0.3 N NaOH, 10 mM EDTA were placed on top of an alkaline sucrose gradient (10 to 30% sucrose in 0.3 N NaOH, 10 mM EDTA), and alkaline cell lysis was allowed to proceed for at least 16 h (Burger and Doerfler, 1974). The cell lysate was then centrifuged for 3 h at 35.000 rpm in the SW41 rotor of a Beckman ultracentrifuge. After centrifugation, 3-drop fractions were collected and the ³H activity in each fraction was determined in a liquid scintillation counter.

In experiments designed to search for the production of Ad12 virions with their authentic buoyant density, BHK21, HeLa, BHK-hCAR or hCAR-transfected BHK21 cells were infected with Ad12 at an moi of 200. At 6 h p.i., ³H-thymidine was added to the maintenance medium at 35 µCi/ml. At 80 h p.i., cells were opened by ultrasonic treatment and virus was purified following standard procedures. Ad12 was identified by equilibrium centrifugation in CsCl density gradients as described earlier (Doerfler, 1969).

Quantitative “two step” RT-PCR

For the quantification of Ad12 mRNA synthesis, total RNA was isolated from mock- or Ad12-infected HeLa, BHK21 cells or hCAR-transfected or hCAR-transgenic BHK21 cells by using the Qiagen RNeasy purification Kit. An amount of 500 ng of RNA was reverse transcribed to cDNA by superscript III reverse transcriptase and oligo dT-primers (Invitrogen). One tenth volume of the cDNA preparation was then analyzed by quantitative PCR analysis in a LightCycler (Roche) using the “FastStart DNA MasterPlus Sybr Green 1” kit (Roche) and the LightCycler Software version 3.5 for data analysis.

Results

BHK21 cells that express the hCAR gene

It is unclear to what extent and by what mechanism non-permissive BHK21 cells are capable of taking up Ad12 virions and of transporting the viral DNA to the nucleus. We, therefore, studied BHK21 cells and BHK21 cells that expressed the human CAR (hCAR) gene either by transfecting BHK21 cells with the hCAR gene or by using hCAR-transgenic BHK21 cells (BHK-hCAR cells). Expression of the hCAR gene in BHK-hCAR and hCAR-transfected BHK21 cells was documented by fluorescence-activated cell sorting (Fig. 1). As expected, human HeLa cells expressed the receptor protein most actively, BHK21 cells do not synthesize the hCAR protein. However, BHK21 cells transfected with or transgenic for the receptor gene score positive in the FACS assay.

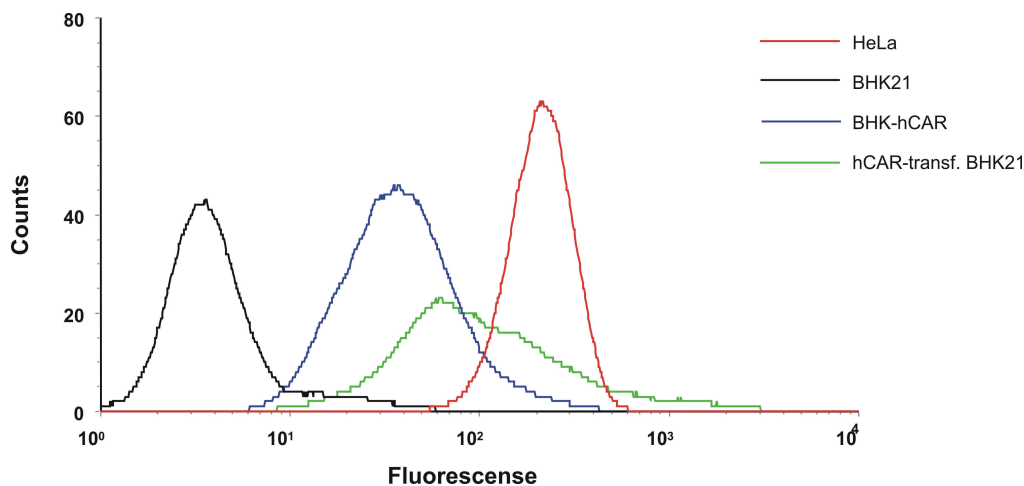


Figure 1. Expression of hCAR in HeLa cells and in BHK21 cells transfected with or transgenic for the hCAR gene. Naïve BHK21 cells served as negative control. Expression of the hCAR protein was determined by fluorescence-activated cell sorting as described under Material and Methods.

Adsorption of Ad12 to uncomplemented or hCAR-complemented BHK21 hamster cells.

Purified Ad12 virions were adsorbed at 4°C to human HeLa, hamster BHK21 or BHK-hCAR cells in Dulbecco medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Subsequently, the cells were fixed and prepared for immunofluorescence by using an antiserum against the viral protein IX. Adsorption of Ad12 to human cells was by far more efficient than that to hamster cells (Fig. 2A and C). At 2 h after inoculation, intracellular Ad12 virions were hardly detectable in non-transgenic BHK21 cells (Fig. 2D), whereas in human cells penetration had

proceeded effectively (Fig. 2B). Intracellular Ad12 virions were not detectable in non-transgenic BHK21 cells by the protein IX antibody as late as 72 h p.i. BHK-hCAR cells, that were maintained in the presence of 1 mg/ml G418 in the cell culture medium to assure the continued expression of the transgene in all cells, were inoculated with Ad12 (Fig. 2E). At 2 h p.i., viral adsorption and penetration were determined by immunofluorescence using the anti-Ad12-protein IX antibody. Most of the cells contained virus particles in distinct perinuclear areas of the cytoplasm (Fig. 2F), a distribution pattern not observed in permissive human HeLa cells. The same results were obtained when G418 was omitted from the maintenance medium of Ad12-infected BHK-hCAR (data not shown). As protein IX is most likely not entering the cell nucleus, the use of anti-IX antibodies did not reveal presence of subviral particles in the nucleus. We conclude, the expression of the human Coxsackie-Adenovirus receptor (hCAR) in BHK21 cells enables Ad12 virions to enter efficiently into the cytoplasm of BHK21 cells.

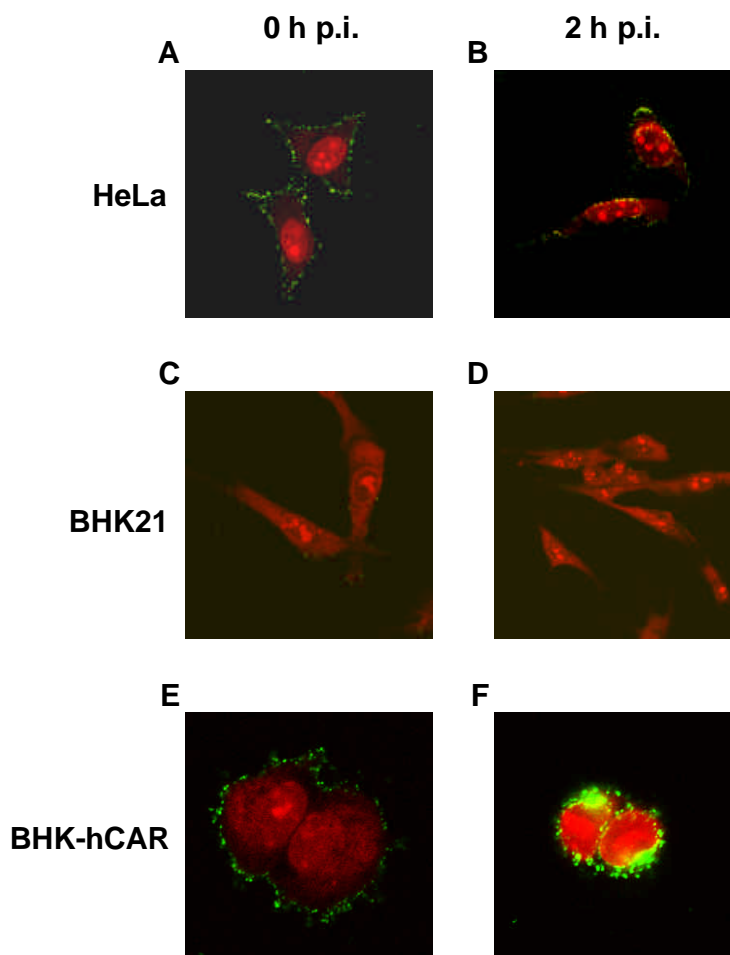


Figure 2. Adsorption and penetration of Ad12 in different cell systems as determined by immunofluorescence with a protein IX antibody. Ad12 virions were adsorbed at 4°C to HeLa (A and B), hamster BHK21 (C and D) or BHK-hCAR cells. The cells were either fixed directly after 30 min incubation with Ad12 at 4°C (A, C and E) or were shifted to 37°C for 2 hours (B, D and F). Ad12 virions were detected by immunofluorescence staining with rabbit polyclonal antiserum against Ad12 protein IX.

No Ad12 virion production in hCAR-expressing BHK21 hamster cells

BHK-hCAR and hCAR-transfected BHK21 cells were inoculated with Ad12 at an moi of 500. Starting at 24 h p.i., a very distinct cytopathic effect (CPE) with cell swelling and nuclear enlargement was observed which was absent from mock-infected cells and from naïve, non-transgenic Ad12-infected BHK21 cells. In Fig. 3, cells were photographed 30 h p.i. with Ad12. The CPE in productively Ad12-infected HeLa cells developed earlier and with different cell pathology. The CPE in Ad12-infected hCAR-transfected or hCAR-transgenic BHK21 cells continued to progress. All mock-infected cells failed to develop cytopathology.

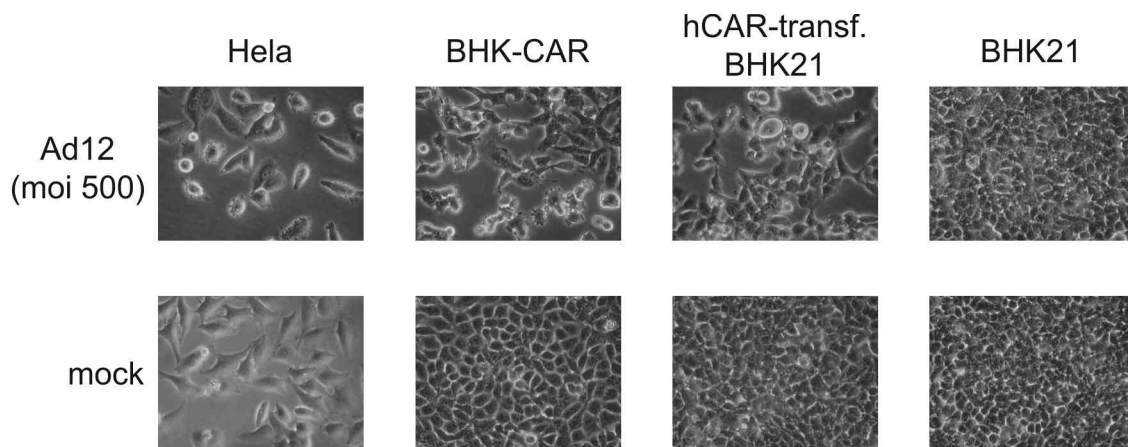


Figure 3. Ad12 elicited a progressive cytopathic effect in BHK21 cells expressing the hCAR gene. Ad12-infected HeLa cells served as positive, non-transgenic BHK21 cells as negative controls. Mock-infected cells were treated with PBS devoid of virus. Photographs were taken 30 h p.i. with 500 pfu of Ad12 per cell in a Zeiss Axiovert 10 microscope at 20 fold magnification.

At 96 h p.i., the maintenance medium and extracts of these cells were assayed for the presence of infectious Ad12 virions by plaque assay (hCAR-transfected BHK21 cells) or by inoculating susceptible human HeLa cells (hCAR-transgenic BHK21 cells). Medium or extracts from Ad12-infected hCAR-BHK21 cells showed no increase, rather a decrease of Ad12 titers by plaque assay on human A549 cells. Controls with Ad12-infected HeLa cells showed Ad12 replication as expected. Moreover, when the infectivity of medium and extracts from Ad12-infected hCAR-transfected BHK21 cells was assessed by inoculating monolayers of HeLa cells, cytopathic effects did not develop as late as 10 days after infection. Medium or extracts from Ad12-infected HeLa cells elicited CPE three days after infection in susceptible HeLa cells.

We also inoculated HeLa cells, BHK21 cells or BHK21 cells transfected with or transgenic for the hCAR gene with 200 pfu of Ad12 per cell. At 6 h p.i., the cells were labeled with 70

μCi of ^3H -thymidine (20-30 Ci/mmol). At 80 h p.i., the infected cells were analyzed for the presence of ^3H -labeled Ad12 virions by standard CsCl equilibrium centrifugation (Doerfler, 1969) (Fig. 4). While HeLa cells produced Ad12 virions, the uncomplemented or h-CAR-complemented BHK21 cells did not support the replication of Ad12 virions.

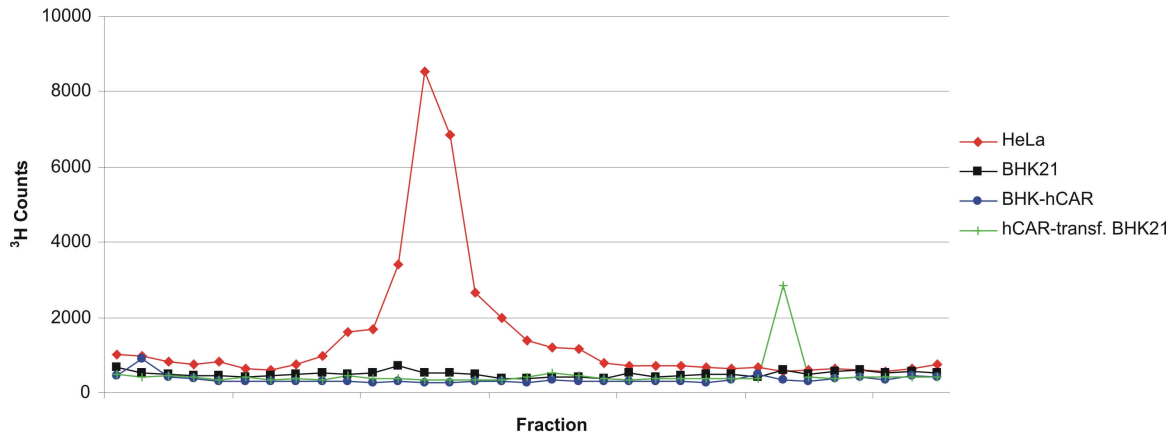


Figure 4. ^3H -thymidine labeling of Ad12-infected HeLa, BHK21, BHK-hCAR, or hCAR-transfected BHK21 cells. Analysis of virions at 80 h p.i. with Ad12 at a multiplicity of 200 pfu/cell by equilibrium sedimentation in CsCl density gradients following standard procedures (Doerfler, 1969; Hosel et al., 2001). The first 16 and last 4 fractions were omitted from this picture.

We conclude that the expression of the hCAR receptor in either transfected or transgenic BHK21 cells does not lead to the replication of Ad12 virions in these hamster cells.

Quantification of intranuclear Ad12 or Ad2 DNA in human HeLa and hamster BHK21 cells

We next measured the amounts of viral DNA imported into the nuclei of Ad2- or Ad12-infected human or BHK21 hamster cells between 2 and 24h p.i. by using the quantitative PCR LightCycler method (Fig. 5A). Ad2 DNA was transported into the nuclei of human HeLa and hamster BHK21 cells, however, less efficiently into the nuclei of hamster than of human cells. Ad2 DNA replicated in both cell types. Only low amounts of Ad12 DNA were detectable in the nuclei of BHK21 hamster cells (Fig. 5A). Based on the data in Fig. 5A, the number of Ad12 DNA molecules per nucleus at 2 or 4 h p.i. appeared to be more than two logs lower in hamster BHK21 than in human HeLa cells. This finding was consistent with the very limited adsorption of Ad12 virions to hamster as compared to human cells. While Ad12 DNA replication started at about 12 to 14 h p.i. in human HeLa cells (Scheidtmann et al., 1975), the

amount of Ad12 DNA in BHK21 cells decreased steadily over the 24 h period investigated. There was no evidence for Ad12 DNA replication in the naïve BHK21 cell system.

A similar quantification experiment, that compared the intranuclear uptake of Ad12 DNA between human HeLa cells and hCAR-transfected or hCAR-transgenic BHK21 cells, revealed an at least ten fold higher amount of Ad12 uptake by the hCAR-complemented BHK21 cells that even slightly surpassed that in HeLa cells, but no evidence for viral DNA replication in uncomplemented or hCAR-expressing BHK21 cells (Fig. 5B). Thus the hCAR-supported increase in intranuclear uptake of Ad12 DNA in BHK21 cells did not lead to viral DNA replication.

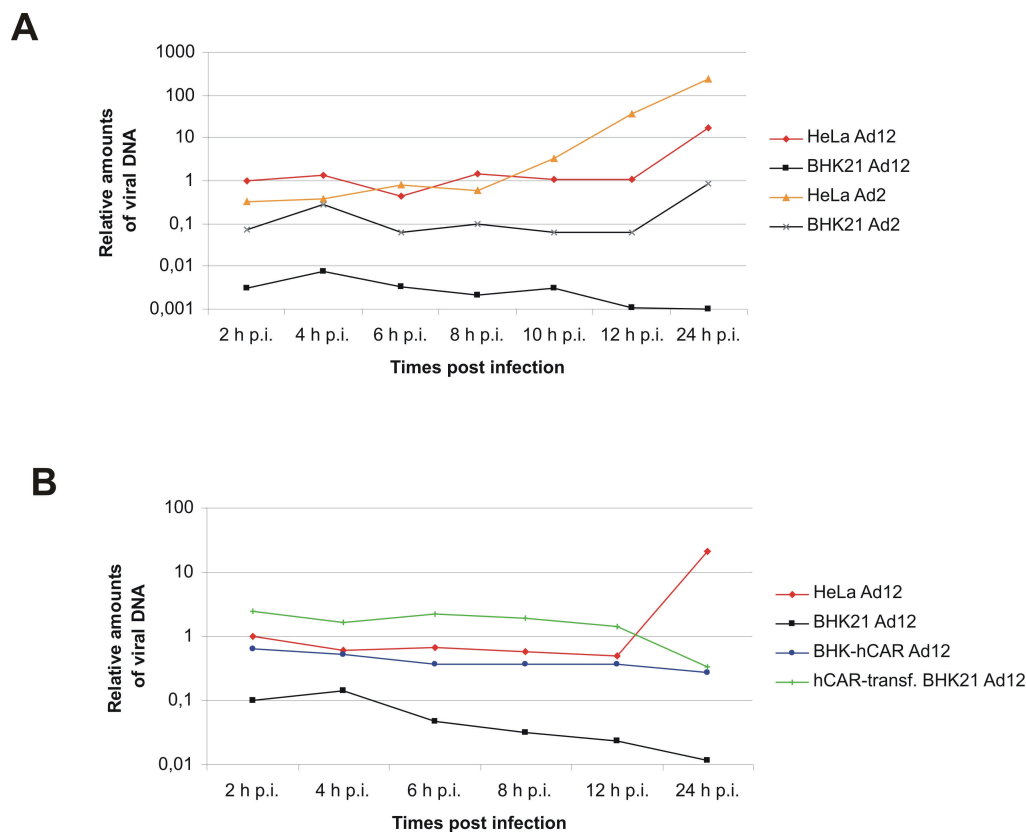


Figure 5. Quantification of Ad2 or Ad12 DNA in virus-infected HeLa, BHK21, BHK-hCAR, or hCAR-transfected BHK21 cells. (A) Quantitative time course analyses of Ad2 or Ad12 DNA in the nuclei of infected HeLa or BHK21 cells. Cells were infected with either Ad2 or Ad12 at an moi of 30 for time periods between 2h and 24h as indicated. Nuclear DNA was then isolated and 100 ng were applied to the LightCycler quantitation with Sybr Green dye. PCR primers were selected for a 536 bp fragment within the E1A region of Ad2 or Ad12. Each curve represents the relative amounts of viral DNA found in HeLa or BHK21 cells infected with Ad2 or Ad12. The amount of Ad12 DNA in HeLa cells at 2 h p.i. was arbitrarily set at 1. (B) Similar experiments were performed by infecting HeLa, BHK21, BHK-hCAR and hCAR-transfected BHK21 cells with Ad12 at an moi of 200. Amplification of a 78 bp fragment within the MLP region of Ad12 was detected with 2× qPCR Sybr Green-Mastermix from Qiagen.

Failure of Ad12 DNA to replicate in hCAR-expressing BHK21 hamster cells

We also investigated the possible replication of Ad12 DNA in Ad12-infected BHK-hCAR or transfected BHK21 cells as well as in BHK21 and HeLa cells by metabolic labeling with ³H-thymidine. Experimental conditions were similar to those described in Fig. 4, except that at 80 h p.i., the cells were lysed on top of an alkaline sucrose gradient (Burger and Doerfler, 1974), and the DNA was analyzed by velocity sedimentation in an alkaline sucrose density gradient (Fig. 6). As positive control, permissive human HeLa cells were infected and analyzed in a similar experiment. In naïve BHK21 cells, in hCAR-transfected or hCAR-transgenic BHK21 cells, there was no evidence for Ad12 DNA replication.

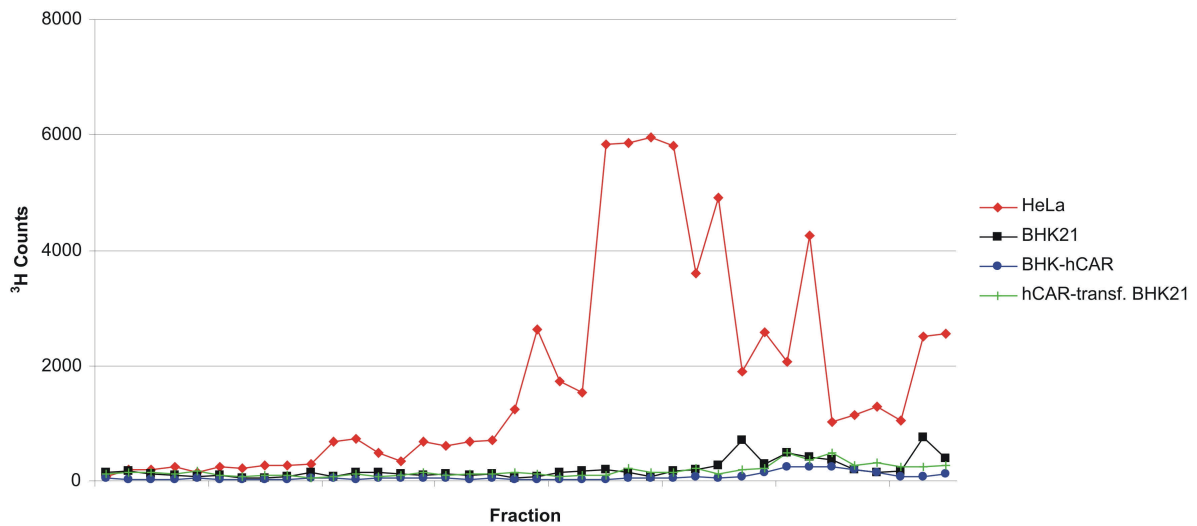


Figure 6. ³H-thymidine labeling of Ad12-infected HeLa, BHK21, BHK-hCAR, or hCAR-transfected BHK21 cells. Analysis of newly synthesized Ad12 DNA by velocity sedimentation in alkaline sucrose gradients. Experimental details were described in the text.

This finding agreed with the quantification of the amounts of Ad12 DNA in these cells presented in Fig. 5A, B. Hence, improved intranuclear uptake even at levels comparable to those in permissive human cells (Fig. 5B) was not sufficient to elicit viral DNA replication in hCAR-complemented BHK21 cells. Ad12 DNA replicated in human HeLa cells, and the data in Fig. 6 revealed the three classes of newly synthesized Ad12 DNA in productively infected cells described earlier: In addition to the main peak of unit length Ad12 DNA, fast sedimenting DNA, that had previously been characterized as viral DNA linked to cellular DNA, and fragments of Ad12 DNA were observed (Doerfler, 1969; Burger and Doerfler, 1974; Schick et al., 1976; Deuring et al., 1981; Deuring and Doerfler, 1983).

Analysis of Ad12 gene expression in human HeLa and hamster BHK21 cells

The transcription of early Ad12 genes was markedly reduced in BHK21 hamster cells as compared to Ad12-infected human cells, and the synthesis of late viral mRNAs was blocked in the non-permissive cells (for review, Doerfler, 1991; Hosel et al., 2003). We now performed time-course analyses of Ad12 gene transcription to document differences between the abortive and the productive systems. Single-stranded (ss)-DNA probes of the 28 major Ad12 genes were constructed to follow their transcription in productively infected human and in abortively infected hamster cells. The use of single-stranded probes rendered impossible interference of transcripts from the opposite DNA strand in the adenoviral genome that is characterized by complex coding profiles.

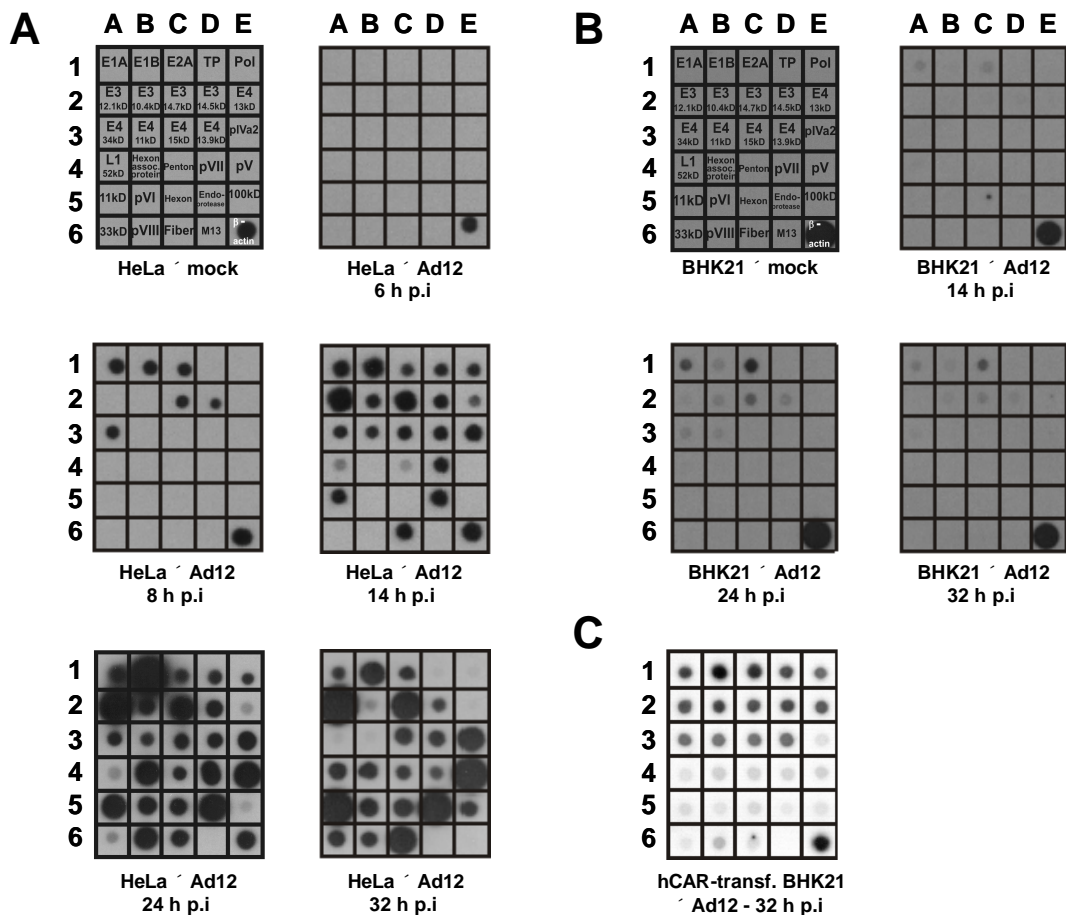


Figure 7. Ad12 gene transcription - analysis by array technique. Transcription patterns of Ad12 genes in productively infected human HeLa cells (A) or abortively infected BHK21 (B) or hCAR-transfected BHK21 hamster cells (C). Total RNA from mock- or Ad12-infected cells was purified at different times after infection and reverse transcribed to cDNA in the presence of α - 32 P-dCTP. The 32 P-labeled cDNA was hybridized to nylon membranes carrying M13-Ad12 ss-DNA arrays corresponding to 28 ORFs of Ad12 DNA. The membranes were subsequently exposed to X-ray films. Positions for the M13-Ad12 ss-DNA arrays as well as for the beta-actin gene or for M13 ss DNA was designated in the panels used for the cDNA from mock-infected cells.

Total RNA was extracted from Ad12-infected human HeLa cells (Fig. 7A) or from Ad12-infected BHK21 cells (Fig. 7B) at times as indicated, reverse transcribed in the presence of ³²P-labeled dNTPs, and hybridized to the M13-Ad12 ssDNA arrays.

In human HeLa cells productively infected with Ad12, the early genes E1A, E1B, E2A, the E3 14.7 kDa and 14.5 kDa protein genes, and the 34 kDa protein gene of E4 were transcribed at 8 h p.i. At 14 h p.i., i.e. at the time viral genome replication commenced (Scheidtmann et al., 1975), all early viral genes as well as the late L1, pVII, 11kD, endoprotease and fiber genes were transcribed. At 24 h p.i., the entire Ad12 transcription program had unfolded with characteristic quantitative differences in the activity of individual early and late viral genes. At 32 h p.i., the mode of viral gene transcription was similar to that at 24 h p.i., except that the transcription of some early genes had decreased (Fig. 7A).

In abortively infected BHK21 cells, detectable viral gene transcription was limited to the E1A and E2A regions at 14 h p.i. At 24 h p.i., transcription of the E1A, E1B, E2A genes, of most of the E3 region and of the 34 kDa and 11 kDa E4 genes was observed at modest levels. At 32 h p.i., the transcription pattern of Ad12 genes resembled that at 24 h, except that the transcription of all previously active genes was fading (Fig. 7B).

Analysis of Ad12 gene transcription in hCAR-transfected BHK21 cells

At 30 h p.i. with Ad12, transcription of the E1A, the pre-terminal protein (pTP), the penton and fiber genes was assessed by the LightCycler relative quantification RT-PCR protocol in Ad12-infected BHK21 cells, which had been previously transfected with the pEGFP-C1 vector or with the hCAR gene, or in Ad12-infected human HeLa cells at 30 h p.i. (Table 1). The transcription of the Ad12 E1A region in the hCAR-transfected and Ad12-infected BHK21 cells was about 6 times lower than in productively Ad12-infected human cells, but at least 50 fold higher than in the uncomplemented BHK21 cell system (Table 1). Transcription levels of the Ad12 pTP gene in hCAR-transfected hamster cells were about 500 times less than in Ad12-infected human cells, but 100 fold higher than in Ad12-infected BHK21 cells without hCAR gene expression. The transcription of the late Ad12 fiber and penton genes in the hCAR gene-complemented hamster cells was always elevated as compared to naïve Ad12-infected BHK21 cells (Table 1).

By the ss-DNA array method, we also analyzed the expression profiles of a total of 28 Ad12 genes in hCAR-transfected and Ad12-infected BHK21 cells. Total RNA from these cells was prepared at 30 h p.i., reverse transcribed and hybridized to the M13-Ad12 ssDNA arrays. In contrast to abortively Ad12-infected hamster cells (Fig. 7C) or to EGFP-transfected and

Ad12-infected BHK21 cells (data not shown), in hCAR-transfected and Ad12-infected BHK21 cells, the transcription levels of all early Ad12 genes were markedly increased. Hence, the expression of the hCAR gene and the thus enhanced uptake of Ad12 templates into the nuclei of Ad12-infected hamster cells led to the transcription of most of the early Ad12 genes in contrast to merely abortively Ad12-infected hamster cells. There was only low level activation of late viral genes in the complemented system.

Table 1. Comparisons of viral gene transcription in Ad12-infected HeLa and in pEGFP- or in hCAR-transfected and Ad12-infected BHK21 cells^a.

	<i>pEGFP-transfected BHK21 cells × Ad12 – 30 h p.i.</i>	<i>hCAR-transfected BHK21 cells × Ad12 – 30 h p.i.</i>	<i>HeLa × Ad12 – 30 h p.i.</i>
E1A	1	5.25×10^1	3.41×10^2
pTP	1	1×10^2	5×10^4
Penton	1	5.4×10^1	5.4×10^4
Fiber	1	5.88×10^2	1.17×10^6

^aDetails of transfection and infection protocols were described under Methods. Cells were infected with 30 pfu of Ad12 per cell, and total RNA was isolated 30 h p.i.. After reverse transcription of the RNA, cDNA was applied for the relative quantitative LightCycler method with Sybr Green dye. For relative quantitation, the levels of Ad12-specific cDNA in GFP-expressing Ad12-infected BHK21 cells were set at 1. Prior to cDNA synthesis, RNA preparations were treated with RNase. Nevertheless, the minimal amounts of Ad12 DNA found in Ad12-infected BHK21 cells could be due to contamination with parental Ad12 DNA or to very low basal transcription levels of late Ad12 genes.

Discussion

Rationale for this study

There are multiple blocks for Ad12 replication in non-permissive BHK21 cells (Doerfler, 1991; Hosel et al., 2001; 2003), and we have tried to overcome them by individually supplying the viral E1, pTP (Hosel et al., 2001; 2003) or the cellular hCAR function, the latter as the transfected gene or in hCAR-transgenic cells (this study). None of these gene products sufficed to release the block of Ad12 replication in BHK21 hamster cells. Obviously, the tight block of Ad12 replication renders each Ad12-infected hamster cell a susceptible candidate to evoke processes that eventually lead to its transformation into tumor cells, because Ad12 virions cannot replicate and destroy the infected cells as Ad2 does in its productive infection of BHK21 hamster cells. In the present study, uptake of Ad12 virions and nuclear import of Ad12 DNA by BHK21 hamster cells was studied to look at the very early stages of Ad12 virion hamster cell interaction.

Synopsis of previous and present work on the abortive Ad12-hamster cell system

- (i) In the Ad5-transformed BHK297-C131 hamster cell line, the viral E1 region is chromosomally fixed in the host genome and constitutively expressed (Visser et al., 1980). Upon infection with Ad12, BHK297-C131 cells allow limited Ad12 DNA replication and reduced transcription of some of the late Ad12 genes. However, even the synthesis of the correct Ad12 fiber mRNA with the authentic nucleotide, leader, and polyA sequences does not facilitate fiber protein synthesis (Schiedner et al., 1994). Ad12 virions fail to be assembled.
- (ii) The over-expression of either the Ad12 pTP or the E1A proteins, or both combined, leads to limited Ad12 DNA replication. However, late viral genes are not transcribed, and the system remains abortive (Hosel et al., 2001).
- (iii) A 33 bp mitigator element has been found in the downstream region of the Ad12 MLP that is not present in the Ad2 genome (Zock and Doerfler, 1990; Zock et al., 1993). This mitigator might be partly responsible for the missing late gene transcription in the abortive hamster cell system.
- (iv) In the present study, import and nuclear entry of Ad12 DNA have been enhanced by the expression of the hCAR gene in Ad12-infected hamster cells either upon

transfection or in hCAR gene-transgenic BHK21 cells. However, increased levels of Ad12 DNA template in the nucleus do not lead to Ad12 DNA replication. The very limited late viral gene transcription and the absence of Ad12 DNA replication do not allow synthesis of infectious virions.

Hamster cell response to Ad2 and Ad12 infections – a paradox?

Ad2 infection and transport of Ad2 DNA into BHK21 nuclei as well as Ad2 DNA replication in BHK21 cells (Fig. 5A) are less efficient than in human HeLa cells. Nevertheless, Ad2 assembles infectious virions in hamster cells. Ad12 fails completely to do that. Apparently, Ad2 is capable of utilizing the hamster CAR or other surface proteins of the BHK21 cells for entry and has been adapted to exploit the mechanisms for transcription, translation and replication in hamster cells. In contrast, Ad12 enters BHK21 cells extremely inefficiently and requires the human CAR for improved uptake and nuclear transport. The majority of residues necessary for the interaction between fiber and human CAR are conserved between Ad2, Ad5, and Ad12 (Law and Davidson, 2005). However, there must still be essential differences in the way the Ad12 and Ad2 fiber structures respond to proteins on the hamster cell surface. Nevertheless, even when Ad12 entry and DNA transport to the BHK21 nuclei is rendered more efficient than in the Ad12-permissive human HeLa cells (Fig. 5B), replication of viral DNA or Ad12 virion production remain impossible. Hence, entry and post-entry mechanisms in hamster cells must be fundamentally different between Ad2 and Ad12. Since Ad2 has developed ways to infect BHK21 hamster cells, the replication machinery of Ad2 has been capable of accommodating to the hamster cell milieu, whereas Ad12 never achieved that goal. Thus, even when Ad12 virion entry is assisted by artificially supplying the hCAR product, essential hamster host factors cannot be functionally utilized by the Ad12 replication mechanism even in the presence of above threshold amounts of imported Ad12 DNA.

It is unproven but likely that Ad2 utilizes the hamster CAR in its productive interaction with hamster cells. In contrast, Ad12 seems to have extremely low, if any, affinity for hamster CAR and/or chooses a completely different entry mechanism. Microglobulins (Law and Davidson, 2005) or other proteins in the hamster cell membrane might be candidates for their interaction with Ad12. The entry pathway into hamster cells available to Ad2 via CAR or other functions apparently channels Ad2 into a unique series of replicative compartments that eventually lead to virus production. Why can Ad12 not utilize the enigmatic, though efficient, entry mechanism exploited by Ad2?

By the same token, the totally aborted interaction mode of the Ad12 genome in hamster cells opens the oncogenic pathway for the virus when it transgresses the human-hamster species barrier. The inefficiently infected cells survive, the viral genome can become integrated into the host genome and elicit processes that transform some of the surviving cells to tumor-like or actual tumor cells.

Acknowledgments

We are indebted to Lennart Philipson, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden for the cloned human CAR gene, to P. Freimuth, Biology Department, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY 11973, USA, for a rabbit antibody against the Ad12 fiber protein, to Werner Seidel, Greifswald University, for the Ad12 protein IX antibody and to Silvio Hemmi and Urs Greber, Zurich University, Switzerland for providing the hCAR-transgenic BHK21 cell line. D. W. and subsequently N. H. have received stipends from amaxa GmbH in Cologne throughout the course of their doctoral theses. For part of his work, Andreas Dorn has been supported by the Institute for Clinical and Molecular Virology, Erlangen University. We thank Birgit Schmitz, Cologne for technical assistance in the early part of this project. This research has been made possible through grants DO 165/17-1 and -2 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Bonn, Germany, by contributions from amaxa GmbH, Cologne and the Institute for Clinical and Molecular Virology, Erlangen University.

REFERENCES

- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell, and R. W. Finberg.** 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**:1320-1323.
- Burger, H. and W. Doerfler.** 1974. Intracellular forms of adenovirus DNA. 3. Integration of the DNA of adenovirus type 2 into host DNA in productively infected cells. *J. Virol.* **13**:975-992.
- Deuring, R. and W. Doerfler.** 1983. Proof of recombination between viral and cellular genomes in human KB cells productively infected by adenovirus type 12: structure of the junction site in a symmetric recombinant (SYREC). *Gene* **26**:283-289.
- Deuring, R., G. Klotz, and W. Doerfler.** 1981. An unusual symmetric recombinant between adenovirus type 12 DNA and human cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**:3142-3146.
- Doerfler, W.** 1969. Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* **38**:587-606.
- Doerfler, W.** 1991. Abortive infection and malignant transformation by adenoviruses: integration of viral DNA and control of viral gene expression by specific patterns of DNA methylation. *Adv. Virus Res.* **39**:89-128.
- Dorn, A., H. Zhao, F. Granberg, M. Hosel, D. Webb, C. Svensson, U. Pettersson, and W. Doerfler.** 2005. Identification of specific cellular genes up-regulated late in adenovirus type 12 infection. *J. Virol.* **79**:2404-2412.
- Granberg, F., C. Svensson, U. Pettersson, and H. Zhao.** 2006. Adenovirus-induced alterations in host cell gene expression prior to the onset of viral gene expression. *Virology* **353**:1-5.
- Greber, U. F. and A. Fassati.** 2003. Nuclear import of viral DNA genomes. *Traffic.* **4**:136-143.
- Greber, U. F., M. Suomalainen, R. P. Stidwill, K. Boucke, M. W. Ebersold, and A. Helenius.** 1997. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* **16**:5998-6007.
- Hohlweg, U., A. Dorn, M. Hosel, D. Webb, R. Buettner, and W. Doerfler.** 2004. Tumorigenesis by adenovirus type 12 in newborn Syrian hamsters. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **273**:215-244.
- Hohlweg, U., M. Hosel, A. Dorn, D. Webb, K. Hilger-Eversheim, R. Remus, B. Schmitz, R. Buettner, A. Schramme, L. Corzilius, A. Niemann, and W. Doerfler.** 2003. Intraperitoneal dissemination of Ad12-induced undifferentiated neuroectodermal hamster tumors: de novo methylation and transcription patterns of integrated viral and of cellular genes. *Virus Res.* **98**:45-56.

- Hosel, M., D. Webb, J. Schroer, and W. Doerfler.** 2003. The abortive infection of Syrian hamster cells with human adenovirus type 12. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **272**:415-440.
- Hosel, M., D. Webb, J. Schroer, B. Schmitz, and W. Doerfler.** 2001. Overexpression of the adenovirus type 12 (Ad12) pTP or E1A gene facilitates Ad12 DNA replication in nonpermissive BHK21 hamster cells. *J. Virol.* **75**:10041-10053.
- Law, L. K. and B. L. Davidson.** 2005. What does it take to bind CAR? *Mol. Ther.* **12**:599-609.
- Lonberg-Holm, K. and L. Philipson.** 1969. Early events of virus-cell interaction in an adenovirus system. *J. Virol.* **4**:323-338.
- Lundholm, U. and W. Doerfler.** 1971. Temperature-sensitive mutants of human adenovirus type 12. *Virology* **45**:827-829.
- Morgan, C., H. S. Rosenkranz, and B. Mednis.** 1969. Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. V. Entry and uncoating of adenovirus. *J. Virol.* **4**:777-796.
- Nemerow, G. R. and P. L. Stewart.** 1999. Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:725-734.
- Philipson, L. and R. F. Pettersson.** 2004. The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **273**:87-111.
- Pickles, R. J., D. McCarty, H. Matsui, P. J. Hart, S. H. Randell, and R. C. Boucher.** 1998. Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. *J. Virol.* **72**:6014-6023.
- Russell, W. C. and G. D. Kemp.** 1995. Role of adenovirus structural components in the regulation of adenovirus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**:81-98.
- Scheidtmann, K. H., J. Ortin, and W. Doerfler.** 1975. Transcription of the genome of adenovirus type 12. Viral mRNA in productively infected KB cells. *Eur. J. Biochem.* **58**:283-290.
- Schick, J., K. Baczko, E. Fanning, J. Groneberg, H. Burger, and W. Doerfler.** 1976. Intracellular forms of adenovirus DNA: integrated form of adenovirus DNA appears early in productive infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **73**:1043-1047.
- Schiedner, G., B. Schmitz, and W. Doerfler.** 1994. Late transcripts of adenovirus type 12 DNA are not translated in hamster cells expressing the E1 region of adenovirus type 5. *J. Virol.* **68**:5476-5482.
- Sirena, D., B. Lilienfeld, M. Eisenhut, S. Kalin, K. Boucke, R. R. Beerli, L. Vogt, C. Ruedl, M. F. Bachmann, U. F. Greber, and S. Hemmi.** 2004. The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J. Virol.* **78**:4454-4462.

- Visser, L., M. W. van Maarschalkerweerd, T. H. Rozijn, A. D. Wassenaar, A. M. Reemst, and J. S. Sussenbach.** 1980. Viral DNA sequences in adenovirus-transformed cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **44**:541-550.
- Walters, R. W., H. W. van't, S. M. Yi, M. K. Schroth, J. Zabner, R. G. Crystal, and M. J. Welsh.** 2001. Apical localization of the coxsackie-adenovirus receptor by glycosyl-phosphatidylinositol modification is sufficient for adenovirus-mediated gene transfer through the apical surface of human airway epithelia. *J. Virol.* **75**:7703-7711.
- Whittaker, G. R., M. Kann, and A. Helenius.** 2000. Viral entry into the nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**:627-651.
- Xia, D., L. J. Henry, R. D. Gerard, and J. Deisenhofer.** 1994. Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure.* **2**:1259-1270.
- Zhao, H., F. Granberg, L. Elfineh, U. Pettersson, and C. Svensson.** 2003. Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J. Virol.* **77**:11006-11015.
- Zock, C. and W. Doerfler.** 1990. A mitigator sequence in the downstream region of the major late promoter of adenovirus type 12 DNA. *EMBO J.* **9**:1615-1623.
- Zock, C., A. Iselt, and W. Doerfler.** 1993. A unique mitigator sequence determines the species specificity of the major late promoter in adenovirus type 12 DNA. *J. Virol.* **67**:682-693.

J.2. PCR-Primer zur Methylierungsmusteranalyse

Die PCRs zur Bestimmung von Methylierungsmustern wurden als verschachtelte PCRs durchgeführt, so dass für ein PCR-Fragment vier Primer benutzt wurden (v = Vorwärts-Primer, r = Rückwärts-Primer, n = Primer für verschachtelte PCR (engl.: nested PCR)).

Nummer im Ad12-Transgenom	Position im Ad12-Genom		Sequenz 5' → 3'	
1	582	33484	v	AAA AAA TTA TCC ACC AAA TAC TCC AAT ATA TC
			r	GGA GTT TAG TGT TTT GTT GTT TAA TTA TTT
	34104	33589	v n	TAT TGG ATT AGT GTT AAT ATT AAA ATG AAG TG
			r n	GAT ATT TTT TTT GGA TAT TTG GGA AT
2	33731	33073	v	TTT GGG GTT ATG TTG TTT AAA TAA GAG
			r	GTT GTT GGT TTT TGA TTT GTA TGA TT
	33668	33133	v n	AAT TTT GTT ATA TTT TTA TAT GGA GTT GTG
			r n	GTG TAA GTT GTA TGT TTT GTG GGA A
3	33292	32537	v	TAT GGT TTA GAT TTT GAG GTG GTG
			r	GGT TGT TTG TAT AGT ATG GTT TGG TT
	33242	32590	v n	GTT TTG GTT GTT GGT AAT GTA TTA TTT A
			r n	TGA TTA AGT TTT TAT GTT TTT ATT TTG TAT
4	32762	32177	v	AGA GTT GTG GTT TTT TTA GAA GTT GTT
			r	TTT TTA TGG TTT GAG TGT AAT AGT TTG ATT
	32716	32228	v n	GTT TAT AAT TTG ATT TGG TTG TGA TTT T
			r n	GTT TTG TGA GGA ATA GTT AAA AGT T
5	32506	31800	v	GTT TTA TTA AAT ATT ATG ATT TGA AGA TAA
			r	GTG ATG TAT GTG GGA AGT ATT TTT GT
	32284	31838	v n	AGA TTG GTA TTA TAT AAT AAG TAT TAA TTA
			r n	GGG AGG TTG TTA ATT ATT TA
6	32045	31394	v	ATG TAT GTG TTG TGT TAT TAT AAA TGT TGA
			r	GTA GGA TAA AAT TAT GGA TTT GGT TTT
	31884	31421	v n	TAA TTA ATA AAA GGT GTT TTT GGT AT
			r n	GAT GGA TAT TGA TTG TTG TTA TTT TTT
7	31599	30936	v	AAG TTG TTT AAG TAA TTG TTG AAA ATA TTG
			r	GTG AGA TTT ATT ATT TGG TTT TTA GTT
	31533	31081	v n	GTT AGT AAT TGT TAA AGG GTT TAA TTA TGT
			r n	AGT AGG ATG GTG TAG AGA AAG GTT G
8	31229	30594	v	ATA AGG TAA AAT GGG AAG GAG GTA GT
			r	GTG GTG GGT TAG GAG TTG TTT ATA GT
	31122	30621	v n	GGT AAT GTA AGA AAA GGA GTA GGA TG
			r n	GTA TTT AGT TTT TGT ATG AGG TTG TAG TTT
9	30767	29968	v	TGT ATT TTT ATA GTG GTA GTA GTA TTT TGG
			r	GTT GTT TGT GTA AAT TTT GTG TTT TA
	30653	30116	v n	TTT GTA TTT AGT TTT TGT ATG AGG TTG TAG
			r n	GTG TGT AAT TTG ATT GGG TGG A
10	34094	582	v	TTA GTT TAG TAT AAG GTA TAT TAT TAG ATA GG
			r	AAA AAA TTA TCC ACC AAA TAC TCC AAT ATA TC
	22	528	v n	TAT TGG ATT AGT GTT AAT ATT AAA ATG AAG TG
			r n	ACC AAA AAA ATC ATT TCA ATT CTC ATA ATA AC
11	301	1092	v	CGA GGG TAG AGT GAA TTT TGA GTT TTT A
			r	CCA CCT CCC ATA ACA CAC TTA CTA T
	435	1024	v n	GTT AAG AGG TTA TTT TTG AGT GTT AG
			r n	TAA ATC AAT ATT TCC AAT ACT ATT CC
12	833	1508	v	GAG ATG GGT TTT TTT TGT AG
			r	CAA CTT TAT ATC CCT ATT TAA CCA C

	936	1477	v r	n n	AGG ACA	AGT AAC	TTT ATT	AGT AAC	TAG AAA	ATT ACA	ATT CTT	TAG CAA	AGT CC	TGT
13	1302	2044	v r		GGA TTA	TTT TTC	GAT CAT	TTA ATT	AGA TAC	GGA TTC	AGA TCC	AAG ACC	AG AC	
	1393	1944	v r	n n	TGG AAT	GTA AAA	ATA TAC	AAA AAA	TAG CCC	GGG TCC	TAA TCT	TGT TCA	G AC	
14	1829	2433	v r		GGT TAT	AAT ATC	TAT TAC	ATT CTC	GGA AAC	TAA TAT	ATG TAC	GAG CCC		
	1862	2376	v r	n n	TTA ACT	TTT ATT	GAG TTA	TTG ATA	GGA ATT	TTA CTA	TAT TAA	GTT CTA	GG CAA	TC
15	2202	2901	v r		GGT TAA	AGG CAA	AGT TTT	TGT CCA	AGG TCA	ATG ACA	AAT CAA	TTT ATA	AG AC	
	2280	2853	v r	n n	ATT AAC	GGT ACC	TAG CCA	AGT CAA	TAT ACC	GGG ATA	AGG TTA	ATA TAC	TG T	
16	2712	3342	v r		AGT ATT	GTT AAC	TGT TTC	TTG CAA	AAA CCT	AAT TTT	GTG ATA	TAT ATC	TTG CC	
	2826	3283	v r	n n	TAA TTC	AGT ATC	ATA ACT	ATA TAA	TGG CTC	TTT ATA	GTG ATC	GGG AAT	TG CC	
17	3050	3770	v r		ATG GTA	TTG AAA	GAA GGT	TTT TGA	GAA GGA	GTG ATT	TTT AGT	TTT TGA	AG TG	
	3208	3719	v r	n n	AAA GAT	TGT TGT	AAT TAT	TGA GTT	GGA TAA	GTT GTT	GAG TGA	AAG AAT	TG TT	
18	3529	4182	v r		ATT GAG	AAT GTG	TTA ATA	TGT TGA	AAT TAT	TAT GAA	TGG GTT	ATT TTG	TT A	
	3622	4156	v r	n n	TGA GTT	TTT AAG	TAG TTG	TTT GGT	TTA GGG	TAA ATG	TTA TAT	TTT T	GGT T	TT
19	3957	4644	v r		ATA GGT	TTG GTA	GTA ATT	TTA AGT	GGT TGG	TAT GTA	TTT GAA	TGG AG		
	3988	4576	v r	n n	GTA GAT	GGA TTA	TTA ATT	TTG TTA	AAG GAT	GGT GGG	TTT GGA	ATG		
20	4519	5289	v r		TGG GGT	GAT GTT	ATA TTC	ATT GTA	TTT GTG	TTT AGG	ATA ATA	AAT T	TTG	
	4562	5248	v r	n n	ATT TTT	TTA TTG	GAT TAG	GGG CGT	GGA GGT	ATT TTT	ATG TAG			
21	5128	5885	v r		GTT TTA	AGT AAT	GTG ACA	CGT AAA	TTT ATA	AAA ATA	TTG CCT	ACC TTT	AAA AAA	
	5186	5768	v r	n n	TTT GTT	CGG TAT	TAA AAT	GGT TTT	AGT TTG	ATT GTG	TTA GTG	ATA GTG	TAA G	
22	5618	6359	v r		TAA AAA	AGG AAT	AAG GTT	TTA AGG	TAT ATA	GGG AAG	AAG ATT	GGT TTT	AT AAA	
	5750	6286	v r	n n	TAT GTT	AAT TTT	TTT TTG	TTG GTG	GTG GTG	GGT GGT	TAT TAT	AA AA		
23	6120	6873	v r		TAG TTT	GTA TTT	TTT TTT	TTA TTT	GGT ATA	GGG GTT	GAA TTT	AAT GAT	TT	
	6230	6804	v r	n n	GTA AAT	AGT GAG	TTT GTA	TAT GTT	TGG ATA	TTT AGT	AGG ATA	TTA TTT	AA AGG	GTA
24	6511	7290	v r		TTT TAA	TTT ATT	AGT TAA	ATT TAA	TTT AAT	ATG TAT	TAA TCT	GTA TAC	GGA C	TAG
	6597	7196	v r	n n	TAG AGT	GAT AAT	GTT ATT	GGG ATT	TTT AAA	AAG TAA	ATG TAT	TGT TTT	AGT GTT	AGT
25	7009	7790	v r		GTT TAT	TGT TAG	GTA TTG	GTT GAA	TTT GAA	TTT TGG	AAA TTG	GAT TTG	GTA AT	TGA
	7071	7671	v r	n n	TAA AGT	ATA ATA	TTG AAT	GTA GGG	TTT ATA	AAA AGT	ATT TGT	TTG TTT	GT TTA	AAT
26	7742	8204	v r		AAA GTA	AAG AGA	TTA GTA	TTT GGT	AAA TGG	GAT AGG	TAG TGT	TAG AGG	TTA TA	AGG
	7566	8140	v r	n n	TTG TTA	GTT TGG	TTA TAG	TTT TTA	AAG GAG	TTT AGA	TAA AAA	TGT GTA	AAG TGT	TTG

27	7930	8865	v	GGA AAA TTA ATA TTA TTT GGT AGT TGT
			r	GTT GAA ATA GGT AGT TTA GGT GG
	8107	8687	v n	TTG TTT ATG GTA TTA GTT AGA GAG AAA AGT
			r n	GTT TAA TAG TGG TTG TAA GGT TAT TA
28	8588	9306	v	TGA GTT ATT TTG GTA GGT AAT TTT TGT TAT
			r	GTT TTA TGT AAA ATG GGA AAT GAG G
	8633	9144	v n	TTT TTT TTG GAG GTT TTT ATG TTT
			r n	GAT TAT AGG TGG TGG GGG TT
29	8907	9787	v	ATT GTA AAA TTG AAA AAT TGG GAG TT
			r	GTA AGT ATT GTT TGT TGA ATT TGG GT
	9097	9750	v n	TTT TTT TTA TTT TTA TTA TTT TTT TT
			r n	GGT TGT AAT AAA GTT AAA TTT GTT A
30	9486	10298	v	TTA GGA AGT TGA GTA ATG TTA TTA ATA ATG
			r	GTT TGG TGG AAA AGT TAT AAG GGT A
	9635	10243	v n	AAG ATT TTT GTA GTA GTT TTG TAT TAA TTT
			r n	TTG AAT GTT TTG GAT ATG GAA AAA
31	10072	11053	v	GGT ATT TAT ATA TGT ATT TGG ATA TTT ATG
			r	GAT AAT GAA ATT TTT AGG GAT GTA ATG TT
	10221	11021	v n	TGA ATG TTT TGG ATA TGG AAA AA
			r n	GTT TAG TTG TTT TTA ATA GTT TAA TAT AGT
32	10802	11938	v	GGT TTA TGT ATT AGT AGT TAA TTT AGT AAT
			r	AAT AGT ATT AAT GTG TAG GTT AAT TTA GAT
	11022	11879	v n	AGA GAT AAT GAA ATT TTT AGG GAT GTA AT
			r n	TAA AGA TGA GGT TGG TTT AAT ATA TA
33	11655	12533	v	TTA TAG TTT TAG ATG ATT GGA TAG
			r	TTA GTA AGT GTT TTT TTA GTA TAT TT
	11817	12467	v n	TTA TTG TAA ATG TTT TGT TGG ATA GTA AAG
			r n	TAT TGG GTT AGG AGG ATA TTG GTA
34	12352	13071	v	TTT GGG TTA TTT AGT TAT TTT GTA T
			r	ATA AAA ATT TTT TTA ATA ATG GTA T
	12410	13022	v n	TAA ATT TAT TAA GAA ATA ATT AGT GTT AG
			r n	ATT AAT AGG TGA AAG TGA ATA TTT AAA TG
35	12842	13745	v	GAT AGT TTG TTT AGT TTT GTA GTT ATT GGA
			r	GGG GTG GAG ATT TAA AAA TTA TTT TAT
	12883	13677	v n	AAA GGA AGT AGG TGA TGA AGG TT
			r n	AGT GTA AAA TAA TGA TTA TTT TTT TAT AGA
36	13409	14275	v	GAA TTG TAG ATA GTG GTT TTT TTT G
			r	GTT TGT AGG ATT AAA ATA TTG TAA GAG GA
	13570	14213	v n	GTA TTT GGT GGA TAA TAA GTT TTT TG
			r n	GTA TGA ATA TTT AGA GGG AGG TAA TAT TT
37	14074	14984	v	TTT AGA TAT AGT ATT GTT TTT AGG TTG
			r	GTA TGT ATG GAG GAG TTA AAA TAA GGT T
	14184	14859	v n	TGT ATG AAT ATT TAG AGG GAG GTA ATA TTT
			r n	GTT TAT AAA GTA TTG GGT ATA GTT TTT TT
38	14558	15545	v	GTT GTA GTA GAA TTA TTG TTA GTT TAT GTT
			r	GTA AGT TTA AAG AAG AGT TGT TGT AGG
	14837	15494	v n	AAA GTA TTG GGT ATA GTT TTT TTA
			r n	TAG AAG ATA AAG AGT GAT TTA ATG TTT GT
39	15131	16096	v	TAG GGT TTA TTG TTG ATG TAG TAA TTG
			r	GTA TTA GAG TAT ATG AAG GTG GAT TTT
	15470	16027	v n	AGA TAA AGA GTG ATT TAA TGT TTG TTA TG
			r n	GGA AGT TAT GGA TGA ATT GTA GTT T
40	15848	16615	v	ATT GGG GAA TTT GTA TAT GGA AAA
			r	GTA TAT TTA TTT TAG GAT ATA GAG GA
	15990	16560	v n	GTG GAA TTA AAA GGG AAG TTA TGG
			r n	TTT TTT AGA TGG TTT TTA TTT GT
41	16338	17204	v	TTT TAT ATT TTT TTA TTG TGT TTA
			r	GAG GTA ATG GTA GAG GAA AAG TTG TT
	16525	17125	v n	TTA TTT TAG TAT TTT TTA ATA AGT TG

			r	n	GGG	AAT	TAA	TGG	AGT	TGT	AGA	TAT	AG	
42	16825	17610	v		TTG	TTT	TAT	GTA	GAT	TAA	ATG	GAA	GAT	ATT
			r		TAA	ATA	GTA	TTG	TGG	GAT	TGG	GAG	TA	
	16942	17441	v	n	GTT	TTT	AAT	TGG	AAT	AGT	ATT	TGG	AG	
			r	n	TGT	TTA	TGA	TTT	TTG	AGT	TGT	TTT	TTT	T
43	17308	18122	v		TAT	GAG	GAA	GTA	ATA	AAA	TAA	GGA	GT	
			r		GTT	TAT	AAT	TTT	TTG	GTA	TTA	AAA	GG	
	17379	18043	v	n	TAT	GGT	TAT	TAG	AGT	GTA	TGG	AAA	AA	
			r	n	GTG	TTA	GAT	ATG	GTT	AGT	TTT	TAT	TTT	G
44	17860	18559	v		TTG	GGA	AAT	AAG	TTT	AGA	AAT	TTT	AT	
			r		GTA	TTT	TGT	GTT	TAA	GTT	TAT	TGT	TAT	TA
	17887	18460	v	n	GTG	GTT	TTT	ATT	TAT	GAT	GTT	ATT	AT	
			r	n	ATA	ATA	TTG	AAT	TTA	AGT	TTT	TTG	ATT	TAG
45	18289	19115	v		TAA	GTA	GGA	TTA	AGT	GAA	TGG	AAT	ATT	AGT
			r		GAT	TTA	AAA	TAT	ATT	TTA	GGA	AAT	AT	
	18343	19061	v	n	AGG	GTA	TTA	AAG	TAA	ATT	ATT	GTA	ATG	TAG
			r	n	GTT	AAT	TTG	TGG	AGA	AGT	TTT	TTG	TA	
46	18860	19739	v		TAG	AGG	ATG	AAT	TAT	TAA	ATT	ATT	GTT	TTT
			r		GGT	TTA	GGG	TTT	GAT	TTT	TAT	TTT	GT	
	18980	19683	v	n	GTG	AAG	TAA	ATT	ATA	TAG	GTA	TTG	GGA	ATA
			r	n	GGT	ATT	TAG	AGG	TTG	GAG	TTT	TAT	T	
47	19518	20321	v		AGT	TTT	TAT	TTT	AGA	AGT	TAT	GTT	AAG	AAA
			r		GGA	TTT	TGG	GTA	AAA	TAT	GTT	GTA		
	19583	20229	v	n	GTG	TTG	TAA	ATA	TGT	TGT	ATT	TTA	TTT	TAG
			r	n	ATA	GTT	GTG	GAA	AGT	ATT	ATA	TAG	AAA	AAG
48	20048	20915	v		GGT	AAG	TTG	TGG	ATA	TTA	TAG	AAT	ATA	AGA
			r		GGT	TTG	TTT	TGT	TGT	ATG	TTT	TTA	T	
	20189	20864	v	n	TTA	TAG	GTT	AAA	TAG	TTG	TGG	AAA	GTA	TTA
			r	n	GTT	ATT	TTA	GAA	AAG	TTA	ATT	TAA	ATT	G
49	20564	21565	v		GAT	TTA	GGT	TGT	GGA	TTT	TAT	TTT	T	
			r		TGT	TGA	GGT	TAA	AAG	GAG	TGA	TTT	T	
	20760	21402	v	n	GAT	TAA	AAT	AAA	TTT	ATT	AGT	TTG	AGT	A
			r	n	GTT	TAT	AAT	ATT	AGG	AGT	AGA	AAT	TTT	GA
50	21121	22063	v		TAA	AAT	GTA	AAA	TGG	ATT	TAA	ATA	AA	
			r		TTT	TTT	TTA	TTA	TTG	TAT	TTT	TG		
	21298	22035	v	n	TTA	CAA	AAA	TAT	ATA	CAA	ACT	TAT	ACC	
			r	n	CCC	TAA	ACT	TAT	TAT	TCC	AAA	ATT	CA	
51	21904	22709	v		TAT	TTA	TTT	TTA	TTA	AAT	GTT	TTT	TG	
			r		GTA	AAG	AAA	TAT	ATG	ATG	GAT	TTG	GAG	
	22007	22673	v	n	GGT	GGG	TTT	TTA	GGA	ATT	TTG	TT		
			r	n	TGT	GAG	TGT	TGA	TTG	TTG	GTT	ATT	ATT	
52	22445	22944	v		TTT	TAA	AAT	TGT	TTT	TGG	TGG	TTT	T	
			r		GAG	GGA	GAT	GTT	TTG	TTT	AAA	TAT	T	
	22484	22869	v	n	TGT	ATT	TTT	TGG	GGA	AAG	AGG	TAT		
			r	n	GAA	TTT	GAA	GGT	TTT	TTT	TAA	ATT	TAA	A
53	22696	23337	v		TGA	TGG	ATT	TGG	AGT	TAT	AGG	AAA	G	
			r		GAG	TAG	TAA	ATG	TTT	TGT	AAA	AAG	AAA	
	22757	23266	v	n	GGT	TGT	TAT	GGA	GAA	GGA	TAA	AAG	TT	
			r	n	TAT	ATT	TGG	GAT	TGT	GTT	TTT	GGA		
54	23139	23826	v		TTG	GTA	ATA	TAT	TAT	ATT	TTT	TTT	AAA	AAT
			r		GTG	TTT	GGT	AGT	AAT	GTT	TGG	AAG	AA	
	23214	23969	v	n	GAG	TTT	TTT	GTT	TTA	AGG	GTT	GG		
			r	n	GTA	ATT	TAG	TTT	TTT	ATA	TGG	GTA	TTT	TGT
55	23505	24404	v		GTT	TAA	TTT	ATT	GAT	AAA	GAT	GTA	AAT	TTG
			r		TTT	TTG	GTT	TGT	AAT	ATT	GAA	TTA	TTA	AGT
	23717	24346	v	n	TAA	AAT	TGA	GGA	ATG	TTT	TTA	TTA	TAT	TTT
			r	n	GAA	GGT	TTA	ATG	GAG	TGT	TAT	TG		
56	24108	24950	v		TTG	TTT	GAT	TTT	ATG	AGT	TAA	AGT	ATG	TTG

			r	TAG	AGG	AGG	AGG	AGG	AAG	GTT	T		
	24169	24866	v	TTG	GGA	TGT	TTT	TTA	GTA	TGT	GTT	GT	
			r	GAA	GAA	TTT	TGG	GAG	AGT	TAG	GTA	GA	
57	24623	25541	v	AGT	TTA	ATT	GTA	TGT	TAT	TAA	GTA	AG	
			r	TAG	AAG	TTT	TGT	TTA	ATA	AAT	ATT	GTT	TTT
	24681	25341	v	GGA	GTG	TAT	TTT	GAT	TTT	TAA	AT		
			r	GGT	AAT	AGT	AGT	AAT	AAG	GAA	AGTT	T	
58	25163	26025	v	GGG	GGA	ATA	TTT	TAT	TTG	TAA	GG		
			r	GTT	ATA	AAA	AGA	GTA	TTT	ATT	AGA	GGG	AAA
	25321	25887	v	TAG	TAG	TAA	TAA	GGA	AAG	TTT	TGA	GG	
			r	TTT	TTT	TTA	TTA	TTG	TAT	TTT	TGT	TT	
59	25721	26473	v	GAT	TTT	ATA	TGA	TTT	TTA	GGG	TGA	ATG	
			r	GGT	GTT	AGA	ATA	ATA	GTT	GAA	AAA	GG	
	25829	26438	v	TTT	GGT	TAG	TTG	TTT	TGA	TAT	ATT	AGG	AAA
			r	GAG	TTT	TTA	GAG	GAG	TAT	TTT	TAG	GGG	
60	26297	26996	v	TGG	ATG	GTT	ATG	ATT	AAT	GTT	TAA	TG	
			r	AGG	TAT	AGA	GGA	AAT	TGT	GTA	TTT	TTT	AAA
	26392	26941	v	TTT	GTG	TTT	TTA	TTT	ATT	TTG	AGT	TTT	TAG
			r	GAT	AAT	AGT	TGT	TGT	TAT	TGA	GTA	TA	
61	26821	27613	v	TTT	TAA	TTT	ATT	AAT	TTG	GGA	TAT	TAT	
			r	TAG	TGG	ATA	AAA	ATT	ATG	TTA	GTT	TAT	TGA
	26879	27489	v	TTT	TTG	TTG	TTT	TAG	TTA	TTG	ATA	AA	
			r	GGT	GGA	AGT	TGG	TTA	TAA	TGT	AAT	TT	
62	27259	28086	v	TTT	GTG	ATT	AAT	ATT	GAA	TAT	TTA	GAT	TAT
			r	GTA	TAG	TAA	TTT	TTT	TAG	GAA	TAA	TTG	GTT
	27354	27933	v	AGT	GTA	ATA	TTT	GTA	TTT	ATA	TTA	ATA	ATG
			r	GGT	AAG	GGT	AGT	TTA	ATT	TTT	TTT	A	
63	27736	28545	v	TTG	AAA	TAA	ATA	TTT	ATT	ATG	ATT	TAA	GAG
			r	TAG	TTT	GGG	TTA	GTT	TTT	GTT	AAT	TAT	ATA
	27854	28482	v	TGA	TTA	TTT	TAA	TAA	GGT	TGT	GTT	TAA	TAA
			r	GGT	TTT	TTT	GTA	GTT	TTA	ATT	ATG	A	
64	28226	28918	v	TTT	TTT	TAT	GTT	TGT	TAG	TTA	TTT	TT	
			r	AAA	AAT	AAA	GAG	TTA	ATT	GAT	TTA	TAA	A
	28319	28821	v	TGA	TTT	TTA	TAT	TTG	TGA	TTG	TTA	TTT	G
			r	GGT	GAA	GAT	GAT	TGA	ATT	TGA	TTT	A	
65	28677	29418	v	TGG	AAT	AAG	TAT	ATT	GAT	GAT	TTT	TT	
			r	TGT	TGA	AGA	AAT	AGA	AGA	AAA	TGA	TGA	T
	28803	29372	v	GAT	GAT	TGA	ATT	TGA	TTT	AGA	AAT	TGA	T
			r	TAT	TTA	TTA	TTT	TTA	TTT	TTT	TTA	GAT	GAA
66	29162	29832	v	GTT	TAA	GAA	ATT	TTT	TAT	TAA	TGA	ATT	AAA
			r	GTT	TGG	GTT	TGG	TTA	TTA	TAG	TTT	TT	
	29264	29777	v	TTG	TTA	AAT	TTG	ATA	GAT	TTG	TAA	ATA	GTA
			r	GGA	TGA	AAG	TTT	AGT	TTT	AAT	AAT		
67	29563	30167	v	GGA	ATT	TTT	ATA	TTT	AAG	TTA	GGG	GA	
			r	GTT	TGT	TGT	TAA	TTT	TTT	GAT	TAT	TTT	ATA
	29665	30131	v	TTA	TAA	GGT	TTT	AAA	TTT	TTT	TGG	AG	
			r	TGT	TTT	TTT	TAA	TAG	TAT	AGG	ATT	TAT	TTT
68	30044	30543	v	GAA	TAA	GTG	TTA	TTA	GTT	TTA	TTA	TAG	TAA
			r	GGA	GTT	GGA	TTT	ATT	TTT	GAT	TTA	AAT	
	30141	30492	v	TGT	TGT	TAA	TTT	TTT	GAT	TAT	TTT	ATA	AGA
			r	TTT	AAT	GTA	GGT	TAG	GGG	TTT	ATA	TTT	AAT
69	30226	30859	v	ATA	AGA	ATA	GGG	GAT	GGT	TTA	ATA	TT	
			r	GTG	GGG	ATA	TAG	ATA	AGG	TTA	ATT	AG	
	30365	30782	v	GGG	GAT	TGG	GAT	TAA	TTT	ATA	ATT	AAT	
			r	TAT	TGT	AGG	AGT	GTA	TTT	AGT	GTT	TGA	TGA
70	30628	31267	v	AGT	TTT	ATA	TAA	GAG	TTA	GAT	GTA	AAA	TTT
			r	TTT	TTT	TTG	TAG	TTG	AAA	ATA	ATT	GT	
	30685	31084	v	ATT	GTT	AAT	GGT	ATT	GTA	AGT	TTA	GTG	G
			r	GGT	TAG	GTT	TAT	TAA	ATT	ATA	TAA	ATT	AGT

71	30869	31525	v	ATA TTG TTA TTA ATG GTT TAG GTT TTA TGT
			r	GAT GAT GTA TAA TTA AAT TTT TTA GTA G
	30918	31494	v n	TAG ATT AAA TGT TAG TGA GGT TAA AAG TTA
			r n	GTT GAT TAT AAT TTT TAA ATA AAA TTG
72	31247	31849	v	TTT GTA GTT GAA AAT AAT TGT ATT TGA ATA
			r	TAT TAT TTT TTT AGG TAT TAA ATG GTT AAT
	31406	31816	v n	ATG ATT TTA TTT TAT AAA AAG TAA TAA TAG
			r n	GAT TTT TAA TAA AGG TGT TTT TTA T
73	31752	32285	v	GTA TGG TTA TTA TAT ATA ATT TTA AAG TAA
			r	GGT ATT TGT TGT ATG GTG TTA ATT TG
	31824	32251	v n	ATT TTT TTA GGT ATT AAA TGG TTA ATA ATT T
			r n	GTA GTT TTT GAT TGT TTT TTA TAG GG
74	32122	32856	v	GTA TTG TAA AAT TTA TAT ATG AAG GAA TGT
			r	GAT TGA ATT ATT TTT AGG TAA TTT TTA TTT
	32226	32795	v n	GTA GTT TTT GAT TGT TTT TTA TAG GG
			r n	GAT AAA TAA AAG TAA AGT AAA TGT ATT
75	32577	33367	v	AGG AGG AGG AGG AAT ATA AGG TAG AG
			r	GAT TTT TGA AAT ATG TTT TAG GTT AG
	32686	33235	v n	TGA AAG ATT ATA GTT AGA TTA AAT TGT AAG
			r n	AGG AGG AGT TAA ATA ATG TAT TAT TAG TAG
76	33065	33665	v	TTG TAT AAA ATT ATA TAA ATT AGA AGT TAG
			r	AAG TAT AAT TTT ATG TGG AGG TAT AAT AAA
	33102	33598	v n	GAA AGT TTA TTT TTA GGT ATA AGT TT
			r n	GTA TAA TGA AAA TAA TGT TTT TAA AT
77	33412	34108	v	GGT GGA AAA ATA ATT TTA TTT AAA AGT AAG
			r	ATT TTA ATA TTG GTA TTA GTT TAG TAT AAG
	33484	34057	v n	GAA TGA TTA AAT AAT AAA ATA TTG AGT TTT
			r n	GTT AAA GTT ATA TTT TTA TTT AAT TAA
Kontrolle 1	33402	32979	v	GGT ATT TTT AAT TTA ATA TAT TTT TAT TTT
			r	GAA TTT ATT GTA GGT GTT TGA AGA TTT AG
	33296	33086	v n	TTT GTA TGG TTT AGA TTT TGA GGT G
			r n	GTG AAT TTT TTT TGT TGT TGG TTT T
Kontrolle 2	23254	23791	v	TTG TGT TTT TGG AAG AGG TGT TTA
			r	GTT AAG TTT GTA AAA TTT TTA ATG TGG A
	23336	23741	v n	AAA TGA ATA AAA TTA TTA TGG GAA TAG TGT
			r n	GTA AAA TTG AGG AAT GTT TTT ATT AT

J.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 Prof. Dr. Walter Doerfler betreut worden.

Teilpublikationen:

Hochstein, N., Muiznieks, I., Mangel, L., Brondke, H., and Doerfler, W. (2007). The Epigenetic Status of an Adenovirus Transgenome upon Long-term Cultivation in Hamster Cells. Submitted.

Webb, D.*, Hochstein, N.*, Hösel*, M., Dorn, A., Auerochs, S., and Doerfler, W. (2007). hCAR-enhanced Entry of Adenovirus Type 12 (Ad12) into Non-permissive Hamster Cells Proves a Necessary but not Sufficient Precondition for Viral Replication. Under Revision.

*Have contributed equally to this manuscript.

Norbert Hochstein

Erlangen im Dezember 2006

J.4. Lebenslauf

Name: Hochstein
Vorname: Norbert
Geburtsdatum: 24.12.1977
Geburtsort: Lennestadt
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1984-1988 Katholische Grundschule Felbecke

1988-1997 Städtisches Gymnasium Schmallebenberg
Abschluss: Abitur

1997-2003 Biologiestudium an der Universität zu Köln
Studienschwerpunkte: Virologie, Genetik, Biochemie, Pharmakologie
Diplomarbeit in der Abteilung Medizinische Genetik und Virologie
bei Prof. Walter Doerfler mit dem Titel: „Untersuchungen der
zellulären Genexpression transgener und nicht-transgener Zelllinien“.
Abschluss: Diplom

2003-2007 Promotion am Institut für Klinische und Molekulare Virologie der
Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen im Labor von Prof.
Walter Doerfler mit dem Titel: „Der epigenetische Status eines
adenoviralen Transgenoms in Hamsterzellen“.

Norbert Hochstein

Erlangen im Dezember 2006

J.5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Walter Doerfler. Er hat mir das Thema dieser Doktorarbeit überlassen und einen Arbeitsplatz in seinem Labor bereitgestellt. Seine wissenschaftlichen Ideen, Ratschläge und Anregungen trugen nicht nur wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei, sondern prägten meine Auffassung von Wissenschaft.

Zitate von W.D.:

„If you want to work in my lab, sign the contract with your blood!“

„You have to be obsessed with science...“

Mein Dank gilt ebenfalls den weiteren Gutachtern dieser Arbeit und Prüfungsvorsitzenden Prof. Jens Brüning, Prof. Ulf Pettersson aus Schweden und Prof. Helmut Klein.

Herrn Prof. Bernhard Fleckenstein möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeiten im hervorragend organisierten Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen durchführen zu können.

Vielen Dank auch den Kollegen aus Köln, Marianna Hösel und Dennis Webb sowie Prof. Indrikis „Indi“ Muiznieks aus Riga, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Der amaxa GmbH, besonders Herrn Rainer Christine, danke ich für die finanzielle Unterstützung der gesamten Arbeit. Die ermöglichten Kongressreisen waren Höhepunkte und Motivation meiner Arbeit.

Ein weiteres „Dankeschön“ für eine schöne Zeit im Laboralltag geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Doerfler-Labors in Erlangen und die Ehemaligen, die mich zu früh verlassen haben (Zitat W.D.: *„Die Buben und Sabrina...“*). Ein herzliches Dankeschön auch an alle MitarbeiterInnen im Institut für Klinische und Molekulare Virologie für so manche Hilfe und den ein oder anderen Mikroliter von Irgendwas.

Ein großer Dank gilt ebenso meiner Familie und Rebecca, ganz besonders meinen Eltern. Ihre Unterstützung ist mir immer sicher und ohne ihr Vorbild in Fleiß und Eifer wäre ich sicher nicht bis hierher gekommen.