

Die Integration adenoviraler DNA in das Genom der Wirtszelle

**Untersuchung der Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler DNA
und Säuger-DNA in einem zellfreien System zur integrativen
Rekombination
und
genomische Lokalisierung von adenoviralen Sequenzen in Ad2-
und Ad12-transformierten Zelllinien**

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

vorgelegt von
Gerd Wronka
aus Dorsten i. Westfalen

März 2002

Berichtersteller: Prof. Dr. Walter Doerfler
Prof. Dr. B6rries Kemper

Tag der m6ndlichen Pr6fung: 2. Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Beobachtungen zur Rekombination von Adenovirus DNA mit dem Säugergenom	2
1.3	Die Entwicklung des zellfreien Rekombinationssystems	6
1.4	Doppelstrangbruchreparatur in Säugerzellen	9
1.5	Das <i>single-strand annealing</i> (SSA) Modell der Doppelstrangbruchreparatur	12
1.6	Isochoren und virale Integrationsorte	12
1.7	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Ergebnisse	
2.1	Das zellfreie Rekombinationssystem und die Charakterisierung der <i>in vitro</i> Rekombinanten	16
2.1.1	Die Standardbedingungen des zellfreien Rekombinationssystems	16
2.1.2	Die Eigenschaften der <i>in vitro</i> Rekombinanten	16
2.1.3	Die Verteilung der Verknüpfungsstellen innerhalb der p7pBR322- und PstI-D-Sequenzen	19
2.1.4	Die Enden der DNA Fragmente bestimmen den Ort der Rekombination	20
2.1.5	Die rechtsterminalen Verknüpfungsstellen	28
2.1.6	Die gewählten kurzen Sequenzhomologien	29
2.1.7	Zwei DNA-Enden als Voraussetzung für die Rekombinationsreaktion ?	32
2.1.8	Das Schicksal der Einzelstrangüberhänge	33
2.1.9	Die Präinsertionssequenz p7	33

2.1.10	Kontrollen zum E. coli Transfektionssystem	37
2.1.11	Das PCR-Nachweisverfahren	38
2.1.12	Die Verwendung von Kernextrakten aus humanen Zellen	40
2.2	Zur Fraktionierung der rekombinationsaktiven Proteine	41
2.2.1	Reinigung der Kernextrakte über einen Glyceringradienten	41
	Zusammenfassung I	43
	Zusammenfassung II	45
2.3	Lokalisierung von Ad2- und Ad12-Sequenzen in den Genomen Ad2- und Ad12-transformierter Zellen	46
2.3.1	Das Profil des BHK21-Genoms	46
2.3.2	Präparative Schwebelichtgradientenzentrifugation	47
2.3.2.1	Kontrollexperimente	48
2.4	Kompositionelle Fraktionierung der Genome einiger Ad12- oder Ad2-transformierter Zelllinien und von Ad12-induzierten Tumorzelllinien	50
2.5	Adenovirus DNA Integration während der produktiven Infektion	57
	Zusammenfassung III	60
3	Diskussion	61
3.1	Merkmale der <i>in vitro</i> Rekombinationsreaktion	61
3.2	Vergleich des zellfreien Systems mit <i>in vitro</i> Rekombinationssystemen zur Doppelstrangbruchreparatur	61
3.3	Bewertung des Rekombinationssystems	63
3.4	Vorschläge für die Entwicklung eines Rekombinations- systems zur Charakterisierung der beteiligten Proteinkomponenten	63

3.5	Sind die Beobachtungen aus dem zellfreien System übertragbar auf einen Integrationsmechanismus der adenoviralen DNA in die zelluläre DNA des Wirtsgenoms ?	65
3.6	Die Rolle der Präinsertionssequenz p7	68
3.7	Organisation des viralen Genoms in den Zellkernen infizierter Zellen	70
3.8	Hinweise auf einen selektiven Integrationsmodus der adenoviralen DNA	72
4	Material	
4.1	Chemikalien und allgemeines Material	77
4.1.1	Chemikalien	77
4.1.2	Allgemeines Labormaterial	79
4.2	Material und Geräte zur Gleichgewichtszentrifugation	81
4.3	Enzyme	81
4.3.1	Restriktionsendonukleasen	81
4.3.2	Sonstige Enzyme	82
4.4	Radioisotope	82
4.5	Kits	82
4.6	Lösungen und Medien	83
4.7	Antikörper	91
4.8	Zelllinien, Viren, Bakterienstämme und Plasmid-DNA	92
4.8.1	Zelllinien	92
4.8.2	Viren	92
4.8.3	Bakterienstämme	92

4.8.4	Plasmid-DNA	93
4.9	Primer	93
4.9.1	Primer für die Nukleotidsequenzbestimmung	93
4.9.2	Primer für den PCR-Rekombinationsassay	94
4.9.3	Primer zur Isochorenanalyse	94
5	Methoden	
5.1	Zellkultur	95
5.1.1	Kultivierung adhärent wachsender Zellen	95
5.1.2	Kultivierung von Zellen in Suspension	95
5.1.3	Bestimmung der Zellzahl	96
5.1.4	Zellproduktion im Rührreaktor mit blasenfreier Begasung	96
5.2	Virusvermehrung und Virusreinigung	96
5.2.1	Infektion von Zellkulturen mit Adenovirus Typ 12	96
5.2.1.1	Adhärent wachsende Zellen	96
5.2.1.2	In Suspension wachsende Zellen	97
5.2.2	Ernte der Zellen	97
5.2.2.1	Adhärent wachsende Zellen	97
5.2.2.2	In Suspension wachsende Zellen	97
5.2.3	Virusisolierung	98
5.2.4	Bestimmung der Konzentration und der Infektiösität des gewonnenen Inokulums	98
5.3	Präparation adenoviraler DNA	99
5.3.1	Aufschließen der Virionen	99
5.3.2	Phenol/Chloroform Extraktion	99
5.3.3	Ethanol-fällung von DNA	99
5.3.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	100

5.4	Präparation genomischer DNA	100
5.5	Pulsfeldgelelektrophorese	100
5.6	Schwebedichtegradientenzentrifugation	101
5.6.1	Analytische Schwebedichtegradientenzentrifugation	101
5.6.2	Präparative Schwebedichtegradientenzentrifugation	101
5.6.3	Analyse der durch isopyknische Zentrifugation fraktionierten DNA	102
5.7	Midpräparation von Plasmid-DNA	102
5.8	Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation) durch Kochlyse	103
5.9	Sequenzieren von Plasmid-DNA	103
5.9.1	Vorbereitung der DNA zum Sequenzieren	
5.9.2	Sequenzierung von Plasmid-DNA	
5.10	Computerunterstützte DNA-Sequenzanalyse	104
5.11	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen und elektrophoretische Trennung der Fragmente in Agarose- oder Polyacrylamidgelen	104
5.12	Transfer von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf positiv geladene Nylonmembranen („Southern-Blotting“)	104
5.13	Radioaktive Markierung der DNA nach der „Oligo-Labeling“-Methode	104
5.14	Hybridisierung von radioaktiv markierter DNA an filtergebundene DNA	105
5.15	Elution und Reinigung elektrophoretisch getrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen (mit der „Biotrap“-Elutionskammer)	105
5.16	Präparation kompetenter Zellen	105
5.17	Transformation	106

5.17.1	Transformation des Bakterienstammes HB101/LM1035	106
5.17.2	Transformation des „Epicurian Sure [®] 2 Supercompetent“- Bakterienstammes	
5.18	Lagerung von Bakterienstämmen in Glycerinkulturen	107
5.19	Untersuchung transformierter Bakterienkolonien auf rekombinante DNA – Koloniehybridisierung	107
5.20	Überprüfung des <i>recA</i> ⁻ -Genotyps	108
5.21	Die <i>in vitro</i> Rekombinationsreaktion und der Nachweis der <i>in vitro</i> Rekombinanten	108
5.21.1	Die Standardbedingungen	108
5.21.2	Identifizierung der Rekombinationsprodukte durch den E. coli Transfektionsassay	109
5.21.3	Nachweis der Rekombinationsprodukte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)	110
5.22	Präparation und Reinigung von Zellkernextrakten	111
5.22.1	Präparation von Kernextrakten aus uninfizierten BHK21-Zellen	111
5.22.2	Fraktionierung der Kernextrakte aus BHK21-Zellen	112
5.23	Proteinkonzentrationsbestimmung	113
5.24	Diskontinuierliche SDS/Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	114
5.24.1	SDS/Polyacrylamidgele	114
5.24.2	Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue R-250	115
5.24.3	Silberfärbung der Polyacrylamidgele	116
5.25	Transfer von Proteinen auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) – Membranen und Detektion mit spezifischen Antikörpern (<i>Western-Blotting</i>)	117
5.25.1	Proteintransfer auf PVDF-Membranen	117
5.25.2	Detektion mit spezifischen Antikörpern	117

5.26	Konzentrierung von Proteinen	117
5.27	Zonensedimentation von Proteinsuspensionen	118
6	Zusammenfassung	120
	Literaturverzeichnis	122
	Anhang	140
	A. <i>In vivo junction sites</i>	140
	B. Die Verknüpfungsstellen der <i>in vitro</i> Rekombinanten	143
	B1. Die linksterminalen Verknüpfungsstellen	
	B2. Die rechtsterminalen Verknüpfungsstellen	
	B3. Verknüpfungsstellen zwischen dem PstI-G Fragment und p7pBR322	
	C. Die p7-pBR322-Sequenz	148
	D. Die Sequenz des PstI-D Fragments	153
	Kurzzusammenfassung	
	Abstract	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Übersicht der <i>in vitro</i> Rekombinanten aus Jessberger et al., 1989	7
Abb. 2	Reinigungsschema der Kernextrakte aus uninfizierten und infizierten BHK 21-Zellen	8
Abb. 3	Das <i>in vitro</i> Rekombinationsassay	17
Abb. 4	Beispiele linksterminaler Verknüpfungsstellen	18
Abb. 5	Verteilung der Verknüpfungsstellen innerhalb der p7pBR322-Sequenz und innerhalb des PstI-D Fragments	19
Abb. 6	Die linksterminale Verknüpfungsstelle der Rekombinante rec 46.7	20
Abb. 7	Suche nach kurzen Sequenzabschnitten innerhalb p7pBR322, die homolog zu den linksterminalen Nukleotiden des PstI-D Fragments sind	22
Abb. 8	Übersicht über die kurzen Sequenzhomologien innerhalb p7pBR322, die homolog zu den linksterminalen Nukleotiden der einzelnen PstI-Fragmente sind.	23
Abb. 9	Suche nach kurzen Sequenzabschnitten innerhalb des PstI-D Fragments, die homolog zu Nukleotidsequenzen des linken Endes von p7pBR322 sind	24
Abb. 10	Suche nach kurzen Sequenzhomologien innerhalb des PstI-D Fragments, die homolog zu Nukleotidsequenzen am rechten Ende des p7pBR322-Plasmides sind.	25
Abb. 11a	Übersicht über linksterminale Verknüpfungsstellen	26
Abb. 11b	Übersicht über rechtsterminale Verknüpfungsstellen	27
Abb. 12	Sequenzmotive innerhalb der p7-Präinsertionssequenz	34

Abb. 13	Die CpG -, GC -, G - und C - Verteilung innerhalb p7pBR322	36
Abb. 14	Das PCR-Nachweisverfahren	39
Abb. 15	Verknüpfungsstellen der <i>in vitro</i> Rekombinante rec HeLa 1	40
Abb. 16	Western-Blot mit Antikörpern gegen Ku 70	42
Abb. 17	Das Profil des BHK21 Genoms	46
Abb. 18	Pulsfeldgelelektrophorese der in präparativen Schwebedichtegradienten eingesetzten genomischen DNA.	47
Abb. 19	Profile von BHK 21 DNA in der analytischen Ultrazentrifuge gemischt mit (a) DNA von Adenovirus Typ 2 DNA und (b) DNA von Adenovirus Typ 12 DNA	48
Abb. 20	Präparative Schwebedichtegradientenzentrifugation von BHK 21 DNA gemischt mit acht Genomequivalenten Ad2 DNA (a) und gemischt mit acht Genomequivalenten Ad12 DNA (b)	49
Abb. 21	Präparative Schwebedichtegradientenzentrifugation mit genomischer DNA der Ad12-transformierten Zelllinie T637 und ihrer Revertanten TR2 und TR12.	53
Abb. 22	Schwebedichtegradientenzentrifugation der genomischen DNA der Zelllinie HA12/7	54
Abb. 23	Präparative Schwebedichtegradientenzentrifugation genomischer DNA der Zelllinien (a) BHK 21 und der (b) Ad12-transformierten Tumorzelllinie CLAC1	55
Abb. 24	Ergebnis der Schwebedichtegradientenzentrifugation der genomischen DNA der Ad2-transformierten Zelllinie HE 5.	56
Abb. 25	Profil humaner DNA in der analytischen Ultrazentrifuge	58
Abb. 26	Das analytische Profil der DNA aus KB Zellen 20 hpi mit Adenovirus Typ 2.	58

Abb. 27	Präparative Schwebedichtegradientenzentrifugation mit DNA aus KB-Zellen 20 h p. i. mit Adenovirus Typ 2	59
Abb.28	Die Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler und zellulärer DNA aus dem Ad12-induzierten Tumor CLAC1 und der Ad12-transfomierten Zelllinie T637	66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Schematische Übersicht der (a) linksterminalen und (b) rechtsterminalen Verknüpfungsstellen	30
Tab. 2	Kontrollen zum E. coli Transfektionssystem	38
Tab. 3	Untersuchte Ad2- und Ad12-transformierte Zelllinien	51
Tab. 4	GC%-Gehalt bekannter Präinsertionssequenzen	52

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ad2	Adenovirus Typ 2
Ad12	Adenovirus Typ 12
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BHK21	<i>baby hamster kidney</i>
<i>Bkg</i>	<i>background</i>
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ci	Curie
CPE	cytopathischer Effekt
cpm	<i>counts per minute</i> - radioaktive Zerfälle pro Minute
Da	Dalton
dest.	destilliert
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonnukleosid-Triphosphate
DTA	DNA-Transfer-Assay
ed.	<i>editor</i> - Herausgeber
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i> - und andere
f	femto -10 ⁻¹⁵
FPLC [®]	<i>fast pressure liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigungskonstante
G	Guanidin
GBF	Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH
GC%	prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin an der DNA-Sequenz
h	<i>hour(s)</i> - Stunde(n)
hpi	<i>hours post infection</i> - Stunden nach der Infektion
IAP	Intrazisternales A-Partikel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
MAR	<i>matrix attachment site</i>
MLP	<i>major late promoter</i>
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger-RNA</i> -Boten-RNA
MW	<i>molecular weight</i> - Molekulargewicht
OD	optische Dichte
oligo	Oligodesoxyribonnukleotide

PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
pcv	<i>packed cell volume</i> - Zellsediment- Volumen
pfu	<i>plaque forming unit</i> - Plaque bildende Einheit
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSL	<i>photo stimulated luminiscence</i>
pTp	präterminales Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SAR	<i>scaffold attachment site</i>
sec	Sekunden
T	Thymidin
TP	terminales Protein
Tab.	Tabelle
U	<i>units</i> - Enzymeinheit
U.p.M.	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolettes Licht
v/v	<i>volume/volume</i> - Volumen/Volumen
w/v	<i>weight/volume</i> - Gewicht/Volumen

1. Einleitung

1.1 Einführung

DNA ist der Informationsspeicher der Zellen; sie trägt alle Informationen, die für die Prozesse des Lebens in der Zelle benötigt werden. Daher ist es fundamental, daß diese Information akkurat von Generation zu Generation weitergegeben wird. Fehler, die aufgrund der Replikation der DNA entstehen, sind äußerst selten.

Doch darf man sich die DNA nicht als starre Abfolge von Informationsträgern vorstellen, vielmehr ist auch die DNA Prozessen bemerkenswerter Dynamik unterworfen. Denn die genetische Information muß zwar einerseits so korrekt wie möglich gespeichert und weitergegeben werden, andererseits aber muß die genetische Variabilität gesichert werden. Vor allem die homologe (meiotische) Rekombination ist verantwortlich dafür, daß der Evolution immer neues Material zur Verfügung gestellt wird. Insofern ist DNA ein besonderes Molekül: es gewährleistet fast fehlerfreie Speicherung der genetischen Information, läßt aber andererseits die notwendige genetische Variabilität zu.

Aber nicht nur während der homologen Rekombination in der Meiose ist die DNA Veränderungen unterworfen; ständig führen Fehler im DNA-Stoffwechsel und äußere Umwelteinflüsse zu Schäden in der Struktur der DNA. Doch dank vielfältiger und effizienter Reparaturmechanismen haben diese Schäden nur selten Konsequenzen. Wie häufig solche Schäden entstehen, wird erschreckend veranschaulicht bei Patienten mit Defekten in DNA-Reparatursystemen.

Darüberhinaus kann in der Säugerzelle fremde DNA mit zellulärer DNA rekombinieren und so in das Wirtsgenom über sogenannte nicht-homologe Rekombinationsprozesse, die auch als illegitime Rekombinationsprozesse bezeichnet werden, integrieren. Nicht-homologe Rekombination findet in Säugerzellen dabei offenbar häufiger statt als homologe Rekombination. Die Grenzen zwischen homologer und nicht-homologer Rekombination sind jedoch unscharf. Die Kenntnisse der rekombinatorischen Vorgänge zwischen fremder (viraler) und Säuger-DNA sind dabei nicht nur für die Tumorstudiologie, sondern auch für die Entwicklung transgener Tiere und für die Gentherapie von großem Interesse. Studien zur Integration und ihrer Konsequenzen sind fundamental zum Abschätzen der Chancen und Risiken möglicher Eingriffe in das Genom menschlicher Zellen. Verantwortungsvolle und erfolgreiche Gentherapie bedarf genauer Kenntnis der ihr zugrundeliegenden Mechanismen. Untersuchungen zur Integration fremder DNA in etablierte Genome höherer Eukaryonten könnten aber auch unter evolutionären Aspekten von Bedeutung sein.

Adenoviren sind doppelsträngige DNA Viren von etwa 36 Kbp (Adenovirus Typ 2) bzw. etwa 34 Kbp (Adenovirus Typ 12). 1962 konnte nachgewiesen werden, daß Adenovirus Typ 12 in neugeborenen Hamstern Tumore induziert (Huebner et al., 1962; Trentin et al., 1962); diese Tumorinduktion ist verbunden mit der Integration von Ad12 DNA in das Hamsterzellgenom durch einen nicht-homologen Rekombinationsmechanismus (Doerfler, 1968, 1996; Doerfler et al., 1983, 1996). Das medizinische Interesse an diesen Integrationsprozessen ist daher hoch. Es ist durchaus denkbar, daß das Integrationsereignis zur Entstehung eines Tumors beitragen kann; zumal die Integration viraler (fremder) DNA möglicherweise auch zu Veränderungen führt, die weit über den Ort der Integration hinausreichen (Heller et al., 1995; Remus et al., 1999; Müller et al., 2001).

Das Modellsystem des Adenovirus kann dazu beitragen, Mechanismen und Konsequenzen der Integration fremder (viraler) DNA aufzuklären. Dabei ist in früheren Arbeiten ein *in vitro* System entwickelt worden, mit dessen Hilfe Reaktionsablauf und die enzymatischen Aktivitäten der integrativen Rekombination detaillierter untersucht werden sollten (vgl. Abschnitt 1.3) (Jessberger et al., 1989b).

1.2 Beobachtungen zur Rekombination von Adenovirus DNA mit dem Säugergenom

Die Vorgänge, die zur Integration adenoviraler DNA in das Wirtsgenom führen, sind bislang weitgehend unbekannt. Studien der Integrationsmuster sowohl in produktiv und abortiv infizierten Zellen als auch in transformierten Zellen und Tumorzellen können allerdings erste Hinweise auf mögliche Mechanismen geben.

Dazu wurden bisher im wesentlichen drei verschiedene Techniken angewandt:

1. Die Lokalisierung interner und terminaler Fragmente der integrierten Adenovirus DNA innerhalb des zellulären Genoms wurde mit Hilfe der „Southern-Blot“-Technik (Southern, 1975) untersucht (Sutter et al., 1978; Stabel et al., 1980).

2. Einzelne Verknüpfungsstellen (*junction sites*) der beiden Rekombinationspartner wurden kloniert und ihre Nukleotidsequenzen bestimmt: in den Ad12 transformierten Zelllinien T637 (Orend et al., 1995; Knoblauch et al., 1996), HA 12/7 (Jessberger et al., 1989a), in der Ad2-transformierten Hamstertumorzelllinie HE5 (Gahlmann et al., 1982; Gahlmann und Doerfler, 1983), in den Ad12 induzierten Hamstertumorzelllinien CLAC 1 (Stabel und Doerfler, 1982), CLAC 3 (Deuring et al., 1981b), T1111/2 (Lichtenberg et al., 1987) T191 und H191 (Orend et al., 1995a; Knoblauch et al., 1996), in der Ad12-induzierten Maustumorzelllinie CBA-12-T-1 (Schulz und Doerfler, 1984), sowie in der symmetrischen Rekombinante SYREC 2 des Ad12 Virus (Deuring et al., 1981a; Deuring und Doerfler, 1983)

3. Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) konnten die Integrationsorte der viralen DNA auf den Chromosomen lokalisiert werden. (Heller et al., 1995; Orend et al., 1995b; Knoblauch et al., 1996; Schröder et al., 1997).

Natürlich hängt das Integrationsmuster der viralen DNA stark vom jeweiligen Virus-Wirt-System ab. In permissiven menschlichen Zellen ist eine dauerhafte Integration nur schwer nachzuweisen, da praktisch keine der infizierten Zellen überlebt, dennoch legen einige Experimente eine kovalente Verknüpfung zwischen viraler und zellulärer DNA in produktiv infizierten Zellen nahe. (Burger und Doerfler, 1974; Schick et al., 1976; Fanning and Doerfler, 1977; Baczko et al., 1978; Doerfler et al., 1980; Deuring et al. 1981; Deuring und Doerfler, 1983). Virale DNA – sehr wahrscheinlich die parentalen Sequenzen – kann sehr früh im Verlauf einer produktiven Infektion in einer hochmolekularen, sehr wahrscheinlich integrierten Form vorgefunden werden. Möglicherweise haben die viralen Sequenzen so eine bessere Chance, vom zellulären Transkriptionsapparat erkannt zu werden (Doerfler et al., 1977). Eine viruseigene Maschinerie zur Integration ist nicht bekannt.

Hamsterzellen sind permissiv für Adenovirus Typ 2 (Ad2) und Adenovirus Typ 5 (Ad5) Replikation. Die durch diese Serotypen transformierten Hamsterzellen tragen daher in der Regel nicht das intakte virale Genom, sondern nur Fragmente der viralen DNA. Intakte Ad2 oder Ad5 Genome würden zu Replikation des Virusgenoms und zum Tod der infizierten Hamsterzelle führen. Im Gegensatz dazu sind Hamsterzellen nicht permissiv für Ad12 Replikation und es können mehrere Kopien von nahezu intakten Ad12 DNA Moleküle integriert vorgefunden werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an diesen verschiedenen Virus-Zell-Systemen können wie folgt zusammengefaßt werden.

I. Gewöhnlich findet man mehrere Kopien der viralen DNA an einer einzigen Stelle im Chromosom integriert. Freie virale DNA in episomaler Form konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Stabel et al., 1980). Die Kopienzahlen variieren von <1 bis >20 (Übersichten in Doerfler, 1982; Doerfler et al., 1983). Diese viralen Kopien können mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) in nahezu allen Fällen an einem Ort des Wirtschromosoms lokalisiert werden. Sind mehrere virale Genome integriert, so scheint keine echte Tandemintegration vorzuliegen, bei der die integrierten viralen Genome unmittelbar aneinanderliegen (Stabel et al., 1980). Vielmehr scheinen die viralen Genome durch kurze zelluläre oder rearrangierte virale Sequenzen voneinander getrennt zu sein (Stabel et al., 1980; Knoblauch et al., 1996). In der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien gibt es weniger Integrationsstellen als Kopien integrierter viraler Genome. So ist die virale DNA entweder an identischen Stellen in repetitive Sequenzen integriert oder, wie es wahrscheinlicher ist, ein oder

mehrere Kopien der viralen DNA sind nach der Integration mit umgebenden zellulären Sequenzen amplifiziert worden (Stabel et al., 1980).

II. Die 5'-Enden des linearen und doppelsträngigen Adenovirusgenoms sind kovalent mit einem terminalen Protein (TP) verknüpft. Das terminale Protein ist u.a. für eine starke Bindung des viralen Genoms an die Kernmatrix der infizierten Zelle verantwortlich (Schaack and Shenk, 1989; Schaack et al., 1990; Fredman and Engler, 1993) und beeinflusst so möglicherweise auch die Wahl des Integrationsortes. Die Aufnahme des Ad12 DNA-TP – Komplexes in Zellen ist weitaus effektiver als die Aufnahme nackter adenoviraler DNA (Schröer et al., 1997). Studien zur Frequenz und Stabilität der chromosomalen Integration von adenoviralen Vektoren zeigen, daß die Fähigkeit der Ad DNA, im Verlauf einer Infektion in ein Wirtschromosom zu integrieren im Vergleich zu nackter Plasmid DNA (nach Transfektion) extrem hoch ist (Harui et al., 1999).

III. Der Ort der Integration auf den Chromosomen ist in unterschiedlichen Ad12-induzierten Tumoren meist unterschiedlich. Es gibt keinen Hinweis auf eine ortsspezifische Integration, nicht einmal in frisch induzierten Hamstertumoren, wo die Möglichkeit, daß Rearrangements von einer bevorzugten Integrationsstelle aus stattgefunden haben, minimiert ist (Hilger-Eversheim und Doerfler, 1997).

In fünf unterschiedlichen Ad12-induzierten Hamstertumorzellen konnte jedoch nachgewiesen werden, daß die Integrationsmuster, die anfangs in den frisch induzierten Tumoren verschieden waren, sich nach wiederholter Passage ähnelten und vielleicht sogar identisch sind (Orend et al., 1994). Die Ursachen dieser Beobachtung sind jedoch noch unklar.

IV. Sequenzanalysen verschiedener Verbindungsstellen viraler und zellulärer DNA in transformierten Zellen und in Tumorzellen aus unterschiedlichen Spezies ergeben keinen Hinweis, daß adenovirale DNA in spezifische DNA Sequenzen integriert wird (Doerfler et al., 1983). Die virale DNA kann in *unique* oder repetitive DNA des Wirtszellgenoms integrieren. Bei der produktiven Infektion humaner Zellen wurde Ad12 DNA bevorzugt in Assoziation mit dem menschlichen Chromosom 1 gefunden, wie für die frühe Phase nach der Infektion beschrieben wurde (Rosahl und Doerfler, 1988).

V. Die Integration der Ad12 Genome erfolgt kovalent in ihrer gesamten Länge oder nahezu vollständig über die Genomenden oder über Sequenzen nahe den Enden der viralen DNA. Die Orientierung der integrierten viralen DNA ist meist kolinear zu der Orientierung der Virion DNA. Allerdings können einige der integrierten Ad12 Genome in ihrer DNA-Sequenzfolge rearrangiert sein (Eick und Doerfler, 1982; Orend et al., 1995a; Knoblauch et al., 1996). Im Gegensatz dazu integriert Ad2 DNA in einer fragmentierten Form oder mit internen Deletionen (Vardimon und Doerfler, 1981; Doerfler, 1982; Doerfler et al., 1983; Gahlmann und Doerfler, 1983).

VI. An den Verbindungsstellen können Deletionen sowohl in der viralen als auch in der zellulären DNA auftreten. Bisher konnten Deletionen von bis zu 174 Bp in den terminalen viralen Sequenzen beobachtet werden (Stabel und Doerfler, 1982). In ähnlicher Weise konnten Deletionen der zellulären DNA an der *junction site* beobachtet werden, nur in einem Fall wurden keine Deletionen in der zellulären Sequenz beobachtet (Gahlmann and Doerfler, 1983).

VII. Kurze DNA Bereiche mit Sequenzhomologien (*patchy homologies*) mit einer Länge von bis zu 13 Nukleotiden zwischen den Rekombinationspartnern an den Verbindungsstellen viraler und zellulärer DNA wurden regelmäßig beobachtet und scheinen eine Rolle bei der Selektion von Rekombinationsorten für die Ad12 DNA zu spielen. Dabei lassen sich zwei Arten kurzer Sequenzhomologien unterscheiden: (i) kurze Homologien zwischen den aneinandergrenzenden viralen und zellulären Sequenzen als auch (ii) zwischen den DNA-Sequenzen der Rekombinationspartner, die sich nach viraler DNA Integration gegenseitig ersetzen (Gahlmann et al., 1982; Doerfler et al., 1983; Schellner et al., 1986).

VIII. Zelluläre Sequenzen an den Verbindungsstellen, die als Rekombinationszielorte der Insertion adenoviraler DNA dienen, die sogenannten Präinsertionssequenzen, sind häufig transkriptionell aktiv (Gahlmann et al., 1984; Schulz et al., 1987; Jessberger et al., 1989a), allerdings nicht immer (Knoblauch et al., 1996). Diese Transkriptionsaktivität kann in der ursprünglichen Wirtszelle vor Kontakt mit viraler DNA sowie in Adenovirus-transformierten Zelllinien und Ad12-induzierten Tumorzellen nachgewiesen werden. Die Analysen der RNAs zeigen Unterschiede in der Länge und Qualität der Transkriptionsprodukte; sie repräsentieren entweder kurze RNAs ohne vollständige offene Leseraster oder längere Produkte mit intaktem Leseraster. Transkribierte zelluläre Sequenzen mit partiell geöffneten DNA-Strängen und assoziierter Transkriptionsmaschinerie könnten eine Chromatinstruktur repräsentieren, die die Integration fremder (viraler) DNA begünstigt.

IX. Die Nukleotidsequenzen der Verbindungsstellen wurden mit entsprechenden Computerprogrammen auf mögliche Sequenzmotive untersucht und in einer Reihe von Fällen gibt es zumindest denkbare DNA-Sekundärstrukturen, insbesondere *stem loop*-Konformationen (Übersicht bei Knoblauch et al., 1996). Über ihr tatsächliches Auftreten und ihre Bedeutung läßt sich aber nur spekulieren.

X. In vielen Fällen sind die Ad12 Genome stabil in das Wirtsgenom integriert und die Integrationsmuster bleiben über viele Zellpassagen konstant (Sutter et al., 1978; Orend et al., 1994). Doch nicht selten sind Revertanten dieser Ad12-transformierten Zellen oder Tumorzellen gefunden worden, die die meisten oder sogar alle Ad12 Genomkopien wieder verloren haben. Diese Beobachtung ist zuerst an der Zelllinie T637 gemacht worden (Groneberg et al., 1978; Groneberg und

Doerfler, 1979; Eick und Doerfler, 1982; Kuhlmann et al., 1982). Möglicherweise haben die Revertanten in Zellkultur Wachstumsvorteile gegenüber den transformierten Zelllinien, doch der Mechanismus des Ausschneidens der viralen DNA ist unbekannt. Einige Beobachtungen deuten an, daß rearrangierte virale DNA an palindromischen Sequenzen ausgeschnitten werden kann (Eick et al., 1983).

Obwohl durch Southern Blot Hybridisierung in einigen Ad12-induzierten Tumorzellen oder Ad12-transformierten Zelllinien keine virale DNA mehr nachgewiesen werden kann, können diese Zelllinien in neugeborenen Hamstern noch Tumore induzieren. Möglicherweise persistieren in einigen dieser Zellen noch virale Sequenzen (Pfeffer et al., 1999).

1.3 Die Entwicklung des zellfreien Rekombinationssystems (Jessberger et al., 1989; Tatzelt et al., 1992, 1993)

Nach der Isolierung und teilweisen Sequenzierung von Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler und zellulärer DNA aus Ad12-transformierten Zellen oder Ad 12-induzierten Tumorzellen kam die Idee auf, ob diese Zielsequenzen, die sich schon einmal *in vivo* als Integrationsort erwiesen hatten, auch von einem zellfreien System erkannt würden. Mit dieser Arbeitshypothese wurden die Präinsertionssequenzen p7 (entspricht einer Verknüpfungsstelle zwischen Ad12 DNA und Hamster DNA in der Zelllinie CLAC1, Stabel and Doerfler, 1982) und p16 (entspricht einer Verknüpfungsstelle aus dem Ad12 induziertem Tumor T1111(2), Lichtenberg et al., 1987) mit verschiedenen Fragmenten des Ad12 Genoms und Zellkernextrakten aus BHK21 Hamsterzellen inkubiert. Sowohl die p7 als auch die p16 Präinsertionssequenz waren dabei in den Vektor pBR322 kloniert. Die adenovirale DNA wurde meist vor der eigentlichen Rekombinationsreaktion noch mit der Restriktionsendonuklease PstI gespalten. In der Tat konnten mit diesem Ansatz Rekombinanten nachgewiesen werden, deren Verknüpfung nicht durch einfache End-zu-End-Verknüpfung, sondern durch genetischen Austausch entstand. Die meisten dieser Rekombinanten wurden bei Einsatz des (internen) PstI-D Fragmentes des Ad12 Genoms (siehe Abbildung 1) und der Präinsertionssequenz p7 nachgewiesen. Kontrollversuche mit einigen zufällig ausgesuchten genomischen Hamstersequenzen oder mit dem Vektor pBR322 und M13 DNA anstatt des p7pBR322 Plasmides ergaben keine Rekombinanten. Darüber hinaus wurden einige Eigenarten der p7-Sequenz festgestellt: ein Auftreten von CCTT-, CTG- und GCCC-Sequenzrepetitionen sowie ein CCTCTCCG-Motiv, das nicht nur unmittelbar an der ursprünglichen CLAC1 Verknüpfungsstelle auftrat, sondern auch in der Nähe einiger *in vitro* Verknüpfungsstellen. Überhaupt traten Verknüpfungsstellen der *in vitro*

Rekombinanten gehäuft innerhalb der Präinsertionssequenz p7 auf. Einige der *in vitro* Rekombinanten wurden im Bereich ihrer Verknüpfungsstellen sequenziert, dabei fiel das häufige Auftreten von sogenannten „*patchy homologies*“ unmittelbar an der Verknüpfungsstelle auf. Ähnliche „*patchy homologies*“ waren auch an einigen Verknüpfungsstellen zwischen viraler und zellulärer DNA (Stabel and Doerfler, 1982; Doerfler et al., 1983; Knoblauch et al., 1996) gefunden worden. Beim zellfreien Rekombinationssystem schienen diese *patchy homologies* eine Rolle in der Auswahl der Rekombinationsorte zu spielen.

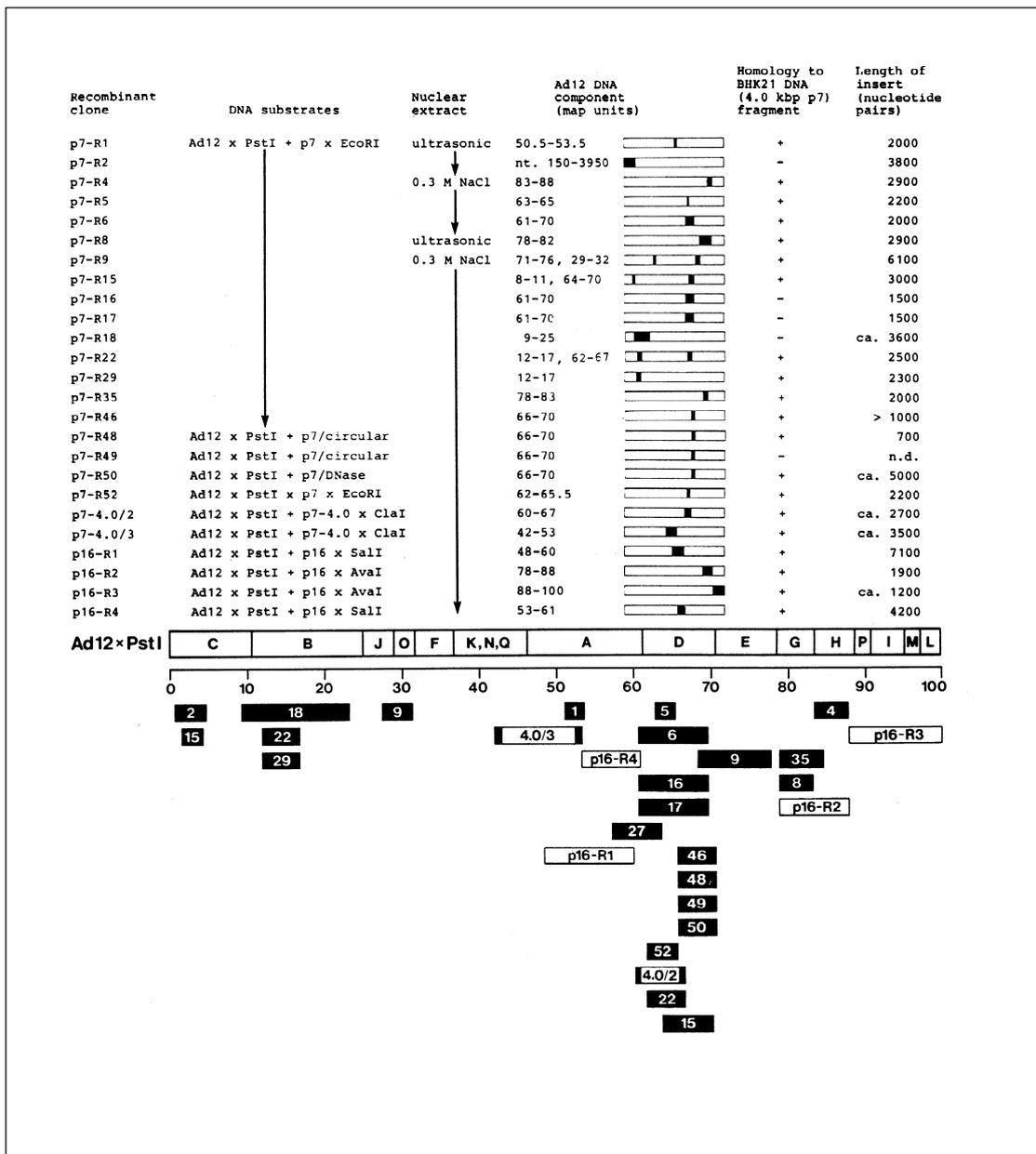


Abbildung 1: Diese Abbildung ist Jessberger et al., 1989 entnommen. Die Balken unterhalb der PstI-Karte des Ad12 Genoms bezeichnen die Abstammung der Ad12 DNA Segmente in den einzelnen, dort beschriebenen Rekombinanten. Die Nummern entsprechen der Numerierung der dort gefundenen Rekombinanten. Von allen eingesetzten PstI-Fragmenten ist das PstI-D Fragment am häufigsten in den Rekombinanten gefunden worden.

Allerdings wurden nicht bei allen *in vitro* Rekombinanten diese „*patchy homologies*“ gefunden. Bei Einsatz von Rohextrakten (Fraktion I) und der mit einer Gelfiltrationssäule gewonnenen Fraktion II traten mitunter auch rekombinante Moleküle auf, deren Verknüpfungsstelle wohl durch einfaches *end-to-end-joining* entstand (Tatzelt et al., 1992; Dissertation J. Tatzelt, 1992). Da die Kombination von p7pBR322 und des PstI-D Fragments von Ad12 zur höchsten Frequenz an Rekombinanten führte (Abbildung 1), wurde diese Paarung während der Fraktionierung des Rohextraktes zum Nachweis verwendet (Tatzelt et al., 1993; Dissertation K. Fechteler, 1996).

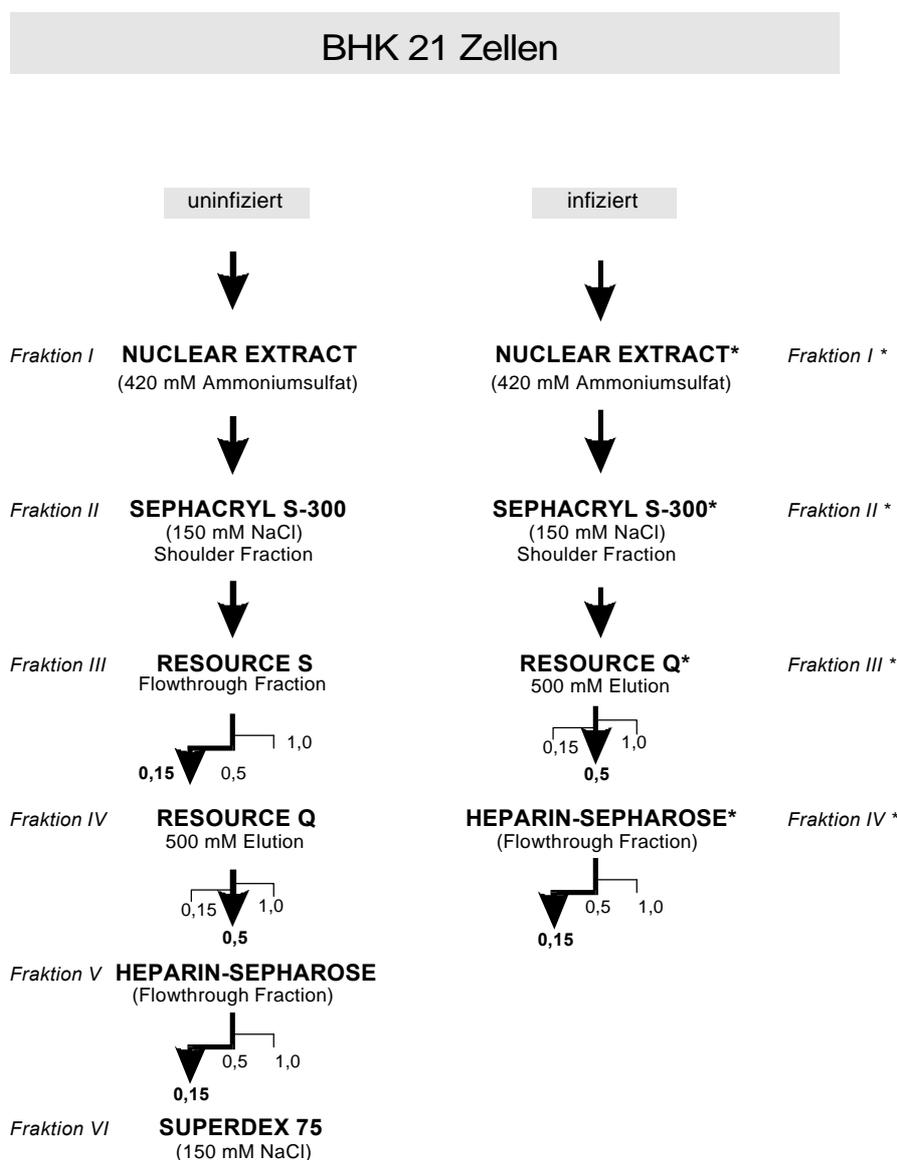


Abbildung 2: Reinigungsschema der Kernextrakte aus uninfizierten oder Ad12-infizierten BHK21 Zellen. Die Rekombinationsfrequenz jeder Fraktion wurde mit dem E.coli Transfektionsassay bestimmt. Die Zahlen 0,15, 0,5 und 1,0 beziehen sich auf die NaCl-Konzentration, die eingesetzt wurde, um die Proteine von der jeweiligen Säule zu eluieren. Die Zahlen , die in den einzelnen Reinigungsschritten dem Pfeil am nächsten sind, zeigen die NaCl Konzentration, bei der die Fraktionen mit der Rekombinationsaktivität von der Säule eluierten.

p7pBR322 wurde dabei stets linearisiert eingesetzt, da bei Einsatz des zirkulären Plasmides p7pBR322 nur sehr selten Rekombinanten nachgewiesen werden konnten. Bei den Aufreinigungsexperimenten wurde der E.coli Transfektionsassay (siehe 2.1.1) zum Nachweis der Rekombinationsaktivität eingesetzt. Durch Anwendung verschiedener chromatographischer Schritte konnten die Kernextrakte ursprünglich nicht infizierter BHK21-Hamsterzellen fraktioniert werden (Abbildung 2). Die am höchsten gereinigte Fraktion VI wies nach elektrophoretischer Auftrennung in silbergefärbtem Polyacrylamidgel acht Hauptbanden, aber auch noch eine Vielzahl schwächerer Banden auf. (Vgl. Abb. 16, Dissertation K. Fechteler, 1996).

Da eine Assoziation zwischen Ad12 DNA und Hamsterchromosomen (Schröder et al., 1997) und Ad12 Integration (Doerfler, 1968, 1970) früh nach der Infektion von BHK21-Zellen mit Ad12 beobachtet wurde, wurden ebenfalls Kernextrakte von Ad12 infizierten BHK21 Zellen 2 h p.i. (Jessberger et al., 1989) und 36 h p.i. (Dissertation K. Fechteler, 1996) präpariert. Diese Extrakte wurden so wie die Extrakte nicht infizierter Zellen fraktioniert. Quantitative Vergleiche der Rekombinationsaktivitäten in der Sephacryl S-300 Fraktion von uninfizierten (II) mit denen von Ad12-infizierten Hamsterzellen (II*) suggerieren eine höhere Rekombinationsaktivität in den Fraktionen aus Ad12-infizierten Hamsterzellen. Die am höchsten gereinigte Fraktion IV* wies eine vergleichbare Zusammensetzung auf wie die der vergleichbaren Fraktion aus Extrakten nichtinfizierter Zellen.

1.4 Doppelstrangbruchreparatur in Säugerzellen

Das charakteristische Merkmal der in dieser Arbeit beschriebenen Rekombinationsreaktion des zellfreien Systems ist die Verknüpfung zweier DNA-Moleküle durch Interaktion zweier kurzer direkter Sequenzwiederholungen. Die Verknüpfung wurde stets begleitet durch die Deletion der zwischen den direkten Sequenzwiederholungen liegenden Nukleotide und einer der beiden Sequenzwiederholungen. Ähnliche Beobachtungen sind auch in Arbeiten zur Doppelstrangbruchreparatur in Säugerzellen gemacht worden.

Säugerzellen können DNA-Doppelstrangbrüche sowohl durch homologe Rekombination (HR) als auch durch Reaktionswege des *non-homologous end joining* (NHEJ) reparieren (Karran, 2000; Khanna and Jackson, 2001). HR trägt zu 30-50 % der Endonukleasen-induzierten Doppelstrangbruchreparatur in sich teilenden Zellen bei. Die HR greift dabei auf zwei Hauptreaktionswege zurück, auf die Genkonversion und auf den *single strand annealing* (SSA) Prozess (vgl. 1.5) (Liang et al., 1998).

Die Unabhängigkeit der NHEJ-Reaktionen von (ausgedehnten) Sequenzhomologien bedeutet nicht, daß Homologie bei diesen Reaktionen keine Rolle spielt. Im

Gegenteil, oft werden kurze homologe Abschnitte in der Größenordnung von 1-10 Bp zur Verknüpfung ausgenutzt. Zur Zeit lassen sich mindestens zwei unterschiedliche Wege des NHEJ unterscheiden: der erste ist abhängig vom heterodimeren Ku-Komplex und verknüpft DNA-Enden – soweit wie möglich – akkurat. Der zweite ist unabhängig von Ku und führt zum Verlust von Nukleotiden an der Verknüpfungsstelle; dabei wird der Ort der Verknüpfung offenbar von Mikrohomologien an den Enden der zu verknüpfenden Partner bestimmt.

Verknüpfungen zweier DNA-Enden, die nicht zu größeren Deletionen führen, wurden in verschiedenen Systemen beobachtet (Roth and Wilson, 1986; Pfeiffer and Vielmetter, 1988). In einem System, in dem Extrakte aus Xenopuseiern verwendet wurden (Pfeiffer and Vielmetter, 1988), wurden Verknüpfungsstellen gefunden, in denen die ursprüngliche Sequenz weitgehend erhalten blieb. So wurden kohäsive Überhänge oder glatte Enden nicht nur so miteinander verknüpft, daß die ursprüngliche Restriktionsschnittstelle wiederhergestellt wurde, auch die Sequenzen nicht-komplementärer DNA-Enden wurden weitgehend erhalten. Dies geschah durch zwei Hauptreaktionstypen, entweder durch einen Auffüllmechanismus (*fill-in reaction*) oder durch eine *overlap*-Reaktion; *fill-in* Verknüpfungsstellen entstanden typischerweise beim Verknüpfen aufeinanderstoßender Enden (glattes Ende/5`-Überhang; glattes Ende/3`-Überhang; 5`-Überhang/3`-Überhang), während *overlap*-Verknüpfungsstellen zwischen Überhängen mit gleicher Polarität gebildet wurden. Ähnliche Verknüpfungsvorgänge wurden auch in Säugerzellen (*in vivo* und *in vitro*) beobachtet (Bøe et al., 1995; Daza et al., 1996; Roth and Wilson, 1986), so daß der in *Xenopus* gefundene Mechanismus auch auf das Säugersystem angewendet werden kann.

Die Proteinkomponenten für diese Art der „akkuraten“ Verknüpfung zweier DNA-Enden durch NHEJ wurden vor allem durch die Analyse von Hamsterzelllinien ermittelt, die empfindlich für ionisierende Strahlung waren und einen Defekt in der Doppelstrangbruchreparatur und in der V(D)J-Rekombination hatten. Diese Arbeiten führten zur Identifizierung von vier Komplementationsgruppen, die an den NHEJ-Reaktionen beteiligt waren (Übersichten bei Jeggo, 1990, 1998). Die entsprechenden Gene (XRCC4-XRCC7) kodieren das XRCC4 Protein, ein essentiellen Kofaktor der DNA-Ligase IV und die drei Untereinheiten der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK): zu diesen gehören die 70 kDa (XRCC6) und die 86 kDa (XRCC5) großen Untereinheiten des heterodimeren, DNA-Enden-bindenden Ku-Komplexes (Ku70/Ku86) und die katalytische Untereinheit der Proteinkinase (DNA-PK_{cs}; XRCC7) (Jackson and Jeggo, 1995; Lieber et al., 1997; Übersicht bei Featherstone and Jackson, 1999). Zusätzlich ist möglicherweise auch der Rad50/Mre11/Xrs2-Nukleasekomplex an der NHEJ beteiligt; darauf deutet zumindest eine direkte Interaktion zwischen Mre11 und Ku70 hin (Goeddecke et al., 1999).

Die Beteiligung der DNA-abhängigen Proteinkinase DNA-PK und des DNA Ligase IV/Xrcc4-Komplexes an der „akkuraten“ Verknüpfung zweier DNA-Enden konnte auch in einem *in vitro* System, in dem Extrakte menschlicher Zellen verwendet wurden (Baumann and West, 1998), nachgewiesen werden.

In Hefe ist effizientes NHEJ nur dann nachweisbar, wenn der Rad52-abhängige homologe Rekombinationsweg ausgeschaltet ist. Tragen diese Stämme wiederum zusätzlich Mutationen in Ku70/80, in der DNA Ligase IV und / oder im Rad50/Mre11/Xrs2-Komplex, dann reduziert sich die NHEJ-Aktivität drastisch auf eine weitaus fehleranfälligere Aktivität, die zu Deletionen führt und Ku-unabhängig ist. Diese Experimente deuten darauf hin, daß der Ku-abhängige Weg des NHEJ (in der Hefe) dominant ist (Boulton and Jackson, 1996; Critchlow and Jackson, 1998).

Der eben erwähnte fehleranfälligere Reaktionspfad des NHEJ ist durch zwei Eigenschaften charakterisiert: (i) er ist unabhängig von Ku70/Ku80 (und der DNA-PK) und scheint sogar nur nachweisbar zu sein, wenn Ku70/Ku80 nicht in Funktion sind; (ii) er führt zu Deletionen, deren Bruchstellen durch Mikrohomologien (1-10 Bp) flankiert sind. Aus diesem Grund ist der fehleranfälligere Weg des NHEJ auch *direct repeat end joining* (Thacker et al., 1992; Mason et al., 1996), *micro-homology-based NHEJ* (Lehman et al., 1994), *modified SSA* (Nicolás and Young, 1994; Nicolás et al., 1995) und *micro-homology-driven SSA* (Göttlich et al., 1998) genannt worden.

Zwar sind die Proteinkomponenten, die für den fehlerhafteren NHEJ Weg verantwortlich sind, noch weitgehend unbestimmt (Fishel et al., 1991), doch die Ähnlichkeit dieses Reaktionsweges mit dem *single-strand annealing* (SSA)-Modell (siehe 1.5) legt die Möglichkeit nahe, daß einige der Faktoren, die am SSA-Vorgang beteiligt sind, auch an dem „fehlerhafteren“ Pfad des NHEJ beteiligt sind.

Ein Protein, das möglicherweise an dieser Art der Verknüpfung beteiligt ist, ist Mre11. In Gegenwart einer DNA Ligase kann Mre11 unter offensichtlicher Ausnutzung kurzer Sequenzhomologien DNA Enden *in vitro* verknüpfen. Mre11 hat auf einem DNA-Doppelstrang eine 3`-5` Exonukleaseaktivität, die durch Zugabe eines anderen DNA-Endes stimuliert wird. Das Ausmaß der Homologie zwischen beiden terminalen Sequenzen bestimmt dabei den Grad der Exonukleasestimulation (Paull and Gellert, 2000).

Mre11 ist Teil des Mre11/Rad50/Xrs2-Komplexes in der Hefe. In Säugerzellen ist Xrs2 sehr wahrscheinlich durch Nbs1 ersetzt. Interessanterweise inhibiert Ku, an ein DNA-Ende gebunden die Mre11-Nukleaseaktivität.

1.5 Das *single-strand annealing* (SSA) Modell der Doppelstrangbruchreparatur

Bricht ein DNA-Doppelstrang zwischen zwei flankierenden homologen Regionen (direkten Sequenzwiederholungen), so wird der Bruch sehr effizient repariert, dabei führt die Reparatur zur Deletion einer Kopie der Sequenzwiederholung und zur Deletion der zwischen den Wiederholungen liegenden Sequenz. Der zugrunde liegende SSA-Mechanismus wurde zuerst in Säugerzellen beobachtet (Lin et al., 1984); er beginnt mit einem extensiven 5`-3`-Abbau der DNA-Enden bis ausreichend große, zueinander homologe Abschnitte (>400 Bp) auf beiden Seiten des Doppelstrangbruchs auf den 3`-Einzelsträngen freigelegt sind. Diese können nun miteinander hybridisieren, wenn sie zueinander komplementär sind (*single strand annealing*). Eine fundamentale Rolle bei diesem Reaktionspfad scheint das Rad52-Protein zu spielen. Ebenso wie der Ku-Heterodimer bindet Rad52 spezifisch an DNA-Enden, um sie vor Nukleaseangriffen zu schützen und um End-zu-End-Interaktionen zu erleichtern (van Dyck et al., 1999, van Dyck et al., 2001). In Hefe werden Doppelstrangbrüche in erster Linie durch Rad52-abhängige homologe Rekombination repariert, in Vertebraten scheinen Doppelstrangbrüche vor allem durch Ku-abhängiges und homologieunabhängiges *end joining* repariert zu werden. Dennoch trägt auch homologe Rekombination zur Doppelstrangbruchreparatur in Säugern bei (Liang et al., 1998). Ku und Rad52 stehen so möglicherweise am Anfang zweier unterschiedlicher Wege für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (van Dyck et al., 1999).

1.6 Isochores und virale Integrationsorte

Die Genome der Vertebraten können als Mosaik aus Isochores betrachtet werden. Isochores sind lange DNA-Abschnitte (>>300 kbp) auf den Chromosomen, die in ihrer Basenzusammensetzung relativ homogen sind (ab einer Größe, die ursprünglich mit etwa 3 kbp angenommen worden war) (Cuny et al., 1981; Bernardi, 2001) und die zu einer kleinen Anzahl von Familien gehören, die durch unterschiedlichen GC-Gehalt charakterisiert sind (GC ist der Anteil von Guanin und Cytosin in der DNA) (Thiery et al., 1976; Macaya et al., 1976; Bernardi, 2000). In den meisten Vertebratengenomen ist das Isochorenmuster gekennzeichnet durch GC-arme *L* (*light*) Isochores, die weite Teile des Genoms ausmachen, während GC-reiche *H* (*heavy*) Isochores nur einen kleinen Prozentsatz des Genoms bilden. Dieses Isochorenkonzept der Chromosomen- und Genomarchitektur, welches ursprünglich auf den Daten der isopyknischen Zentrifugation fußte, wurde später auch durch das Sequenzieren ganzer Genome bestätigt (Bernardi, 2001). Über ihre

Unterschiede im GC-Gehalt hinaus unterscheiden sich die Isochorenfamilien in weiteren wichtigen Eigenschaften. Die Genverteilung im menschlichen Genom (und in den Genomen aller Vertebraten) ist auffallend ungleichmäßig. So steigt die Genkonzentration von einem sehr geringen Mittel in L Isochoren auf einen 20-fach höheren Wert in H3 Isochoren (H1, H2 und H3 sind die Unterfamilien der H Isochoren) (Bernardi et al., 1985; Mouchioud et al., 1991; Zoubak et al., 1996). Isochoren mit unterschiedlichen Genkonzentrationen korrespondieren mit unterschiedlichen Chromatinstrukturen; Chromatinstrukturen, die "offen" in GC-reichen, und "geschlossen" in GC-armen Isochoren sind. Die offenen Chromatinstrukturen sind charakterisiert durch Zugänglichkeit für DNAsen (Kerem et al., 1984), als auch durch einen größeren Abstand der Nukleosomen, das Fehlen der H1 Histone und die Acetylierung der Histone H3 und H4 (Tazi and Bird, 1990). Replikation findet in den GC-armen Isochoren spät und in GC-reichen Isochoren früh im Zellzyklus statt (Federico et al., 1998). Transkription ist sehr aktiv in GC-reichen Regionen, in denen GC-reiche Gene sehr eng beisammen liegen und mit Anhäufungen von CpG-Dinukleotiden, sog. *CpG islands*, assoziiert sind. Dort liegen die meisten der *housekeeping genes*, die konstitutiv exprimiert werden. Demgegenüber ist transkriptionelle Aktivität in GC-armen Regionen weitaus verstreuter; in den GC-armen Isochoren liegen GC-arme Gene weit auseinander, getrennt von ausgedehnten intergenen Sequenzen. Sie sind oft mit TATA-Box-Promotoren assoziiert und werden meist gewebespezifisch exprimiert. Rekombinatorische Vorgänge sind sehr aktiv in GC-reichen Regionen, fehlen aber fast ganz in GC-armen Regionen. Tatsächlich sind die transkriptionell aktivsten auch die rekombinationsaktivsten Regionen.

Die Entwicklung von Methoden für die kompositionelle Fraktionierung von DNA bei hoher Auflösung (Corneo et al., 1968; DeSario et al., 1995) führte zu der Möglichkeit, jede Nukleotidsequenz in kompositionellen DNA-Fractionen zu lokalisieren. Als dies zuerst auf provirale Sequenzen angewandt wurde (Kettmann et al., 1978), zeigte sich, daß retrovirale Integration nicht zufällig ist. Für einige Retroviren wie BLV (*bovine leukemia virus*) (Kettmann et al., 1979, 1980), MMTV (*mouse mammary tumor virus*) (Salinas et al., 1987) und RSV (*Rous sarcoma virus*) (Rynditch et al., 1991), sowie für das DNA Virus HBV (Hepatitis B Virus) (Zerial et al., 1986) und ein Ad5/SV40-Hybrid (Romani et al., 1993) wurde beobachtet, daß die virale und die zelluläre DNA am Integrationsort vergleichbare Sequenzzusammensetzungen haben. Die Autoren schließen daher, daß die häufig beobachteten übereinstimmenden Sequenzkompositionen zwischen viraler und zellulärer DNA die als „isopyknisch“ bezeichnete Integration der viralen DNA favorisiert (Rynditch et al., 1991, 1998).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Der Mechanismus oder die Mechanismen der Integration adenoviraler DNA in das Wirtsgenom und die Faktoren, die die Auswahl des Integrationsortes bestimmen sind noch weitgehend unbekannt. Die Studien an Verknüpfungsstellen aus Ad12- oder Ad2-transformierten Zelllinien ergeben kein klares Bild, sowohl hinsichtlich des Mechanismus als auch hinsichtlich der Ortsspezifität der Integration. Für die Untersuchung des Rekombinationsmechanismus und die Identifizierung der an der Reaktion beteiligten Proteine wurde ein zellfreies Rekombinationssystem entwickelt (Jessberger et al., 1989). Die Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten dieses zellfreien Systems haben zu einem Teil der *in vivo* Verknüpfungsstellen eine große Ähnlichkeit; doch ist der Mechanismus der zellfreien Rekombinationsreaktion bisher nicht genau beschrieben worden; er ist vielmehr allgemein mit Rekombination zwischen adenoviraler und zellulärer DNA umschrieben worden (Tatzelt et al., 1992). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die genaue Beschreibung der Verknüpfungsstellen der Rekombinanten des zellfreien Systems, um daraus Rückschlüsse auf den Rekombinationsmechanismus zu ziehen. Das zellfreie System in seiner bisherigen Form wurde dazu verwendet, die Proteine aufzureinigen, die zu einer Rekombination zwischen adenoviraler und zellulärer DNA führen. Dies gelang bis zu einem gewissen Grade, doch eine sichere Identifizierung der rekombinationsaktiven Proteine blieb bisher aus. Auch blieb die Rekombinationsfrequenz im zellfreien System stets gering (Dissertation J. Tatzelt, 1992; Tatzelt et al., 1993). Mit einer genauen Kenntnis des Rekombinationsmechanismus sollte es möglich sein, ein auf diesen Mechanismus zugeschnittenes zellfreies System zu entwickeln, das für eine effizientere Fraktionierung der rekombinationsaktiven Proteine genutzt werden kann.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Isochorenstruktur des Wirtsgenoms und der Auswahl der Integrationsorte der adenoviralen DNA gibt.

Die Auswahl der Integrationsorte auf den Chromosomen des Wirtsgenoms erscheint bisher nicht spezifisch, auch wenn transkribierte Abschnitte des Wirtsgenoms offenbar bevorzugt sind. Das Genom des Hamsters ist ähnlich wie das aller Säuger unterteilt in unterschiedliche Isochorenfamilien; GC-reiche Isochoren sind dabei weitaus transkriptions- und rekombinationsaktiver als GC-arme Isochore. Untersuchungen an anderen Virusfamilien deuten an, daß die Integration viraler Genome isopyknisch ist, d.h. die Integration erfolgt bevorzugt in die Isochore, die dem GC%-Gehalt des Virusgenoms entsprechen (Zerial et al., 1986; Romani et al., 1993; Übersicht bei Rynditch et al., 1998). In dem zweiten Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob die Integration adenoviraler DNA bevorzugt in bestimmte

Isochorenfamilien stattfindet und ob die Basenzusammensetzung der (weiteren) Umgebung um den Integrationsort die Stabilität der integrierten DNA beeinflusst.

2. Ergebnisse

2.1 Das zellfreie Rekombinationssystem und die Charakterisierung der *in vitro* Rekombinanten

2.1.1 Die Standardbedingungen des zellfreien Rekombinationssystems

In der Einleitung ist schon ein kurzer Abriß über die Entwicklung des Rekombinationssystems gegeben worden. Hier soll noch einmal detaillierter auf die Standardbedingungen des Assays und einige offene Fragen eingegangen werden. Ziel der Untersuchung des zellfreien Systems war die Charakterisierung der Rekombinationsreaktion zwischen adenoviraler und Säuger-DNA, die letztendlich zur Integration der viralen DNA in die zelluläre DNA führt. Die beiden Partner der Rekombinationsreaktion waren das Plasmid p7pBR322 und das PstI-D Fragment von Adenovirus Typ 12 (Ad12). Das Plasmid p7pBR322 mit einer Länge von 6132 Bp trug die Präinsertionssequenz p7, die der Integrationsstelle der Ad12 DNA in dem Ad12-induzierten Tumor CLAC 1 entspricht (Jessberger et al., 1989). Vor der Rekombinationsreaktion wurde dieses Plasmid stets durch die Restriktionsendonuklease EcoRI linearisiert. Das PstI-D Fragment umfaßt die Sequenzkoordinaten 20,880 – 24,049 des Ad12 Genoms (Sprengel et al., 1994). Zur Rekombinationsreaktion wurde die DNA mit fraktionierten Kernextrakten aus BHK21 Hamsterzellen inkubiert. Nach Beenden der Reaktion wurden die entstandenen rekombinanten Moleküle mit Hilfe zweier unterschiedlicher Verfahren amplifiziert und nachgewiesen (Abbildung 3).

Zur Verfügung stand ein PCR Nachweissystem, auf das später eingegangen werden soll (2.1.11), und ein E. coli Transfektionssystem, welches als Standard verwendet wurde. Bei diesem Nachweisverfahren wurde die DNA nach Beenden der Reaktion in recA⁻-E. coli Bakterien transfiziert. Selektioniert wurde auf das Vorhandensein einer Ampicillinresistenz, die daraus resultierenden Kolonien wurden durch Koloniehybridisierung auf Ad12 DNA untersucht. Daher konnten mit dem E. coli Transfektionssystem natürlich nur die rekombinanten Moleküle nachgewiesen werden, die eine Ampicillinresistenz und einen Replikationsursprung trugen. Dies setzte auch das Vorhandensein von zwei Verknüpfungsstellen im rekombinanten Molekül voraus.

2.1.2 Die Eigenschaften der *in vitro* Rekombinanten

Die rekombinanten Klone wurden mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen charakterisiert und im Bereich der Verknüpfungsstellen zwischen PstI-D und

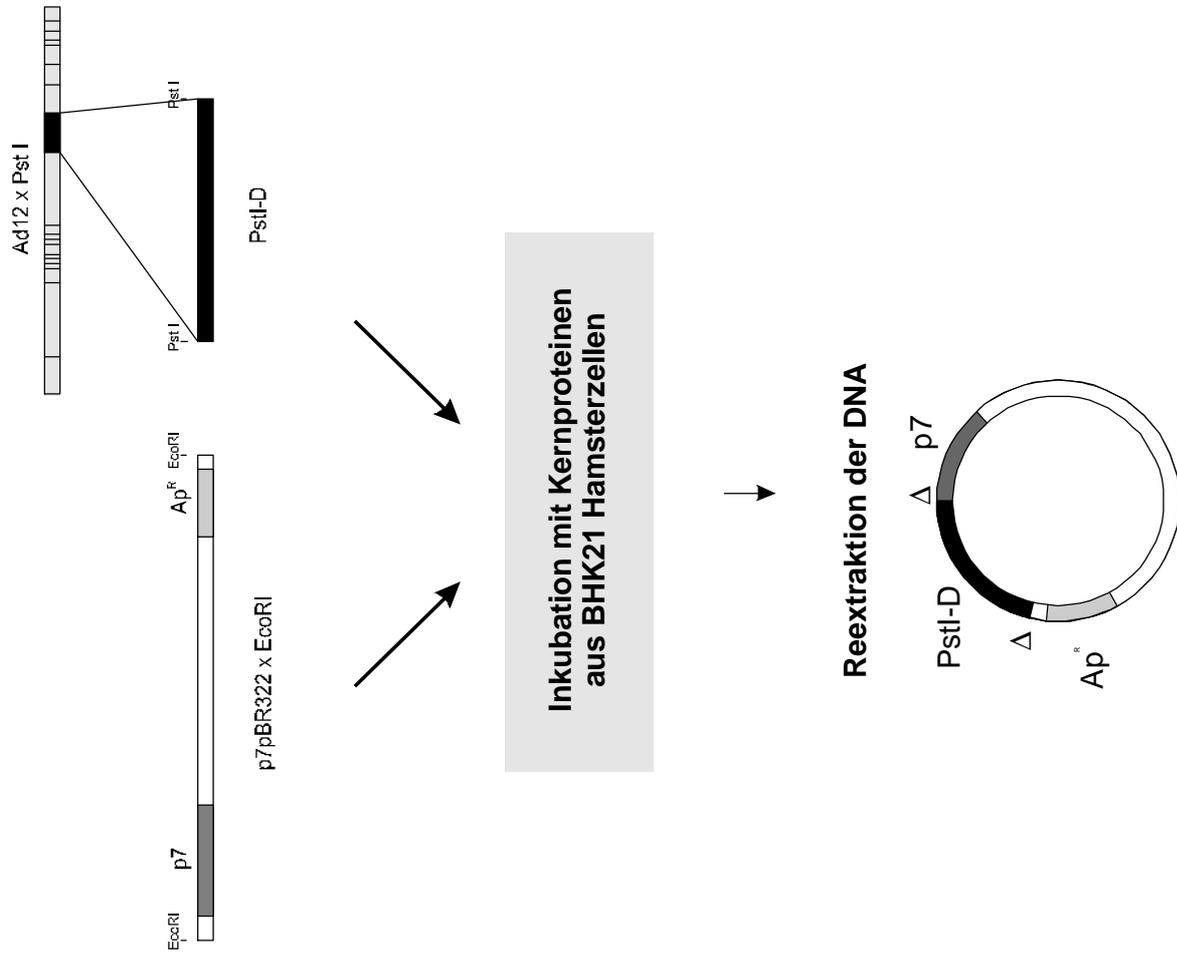
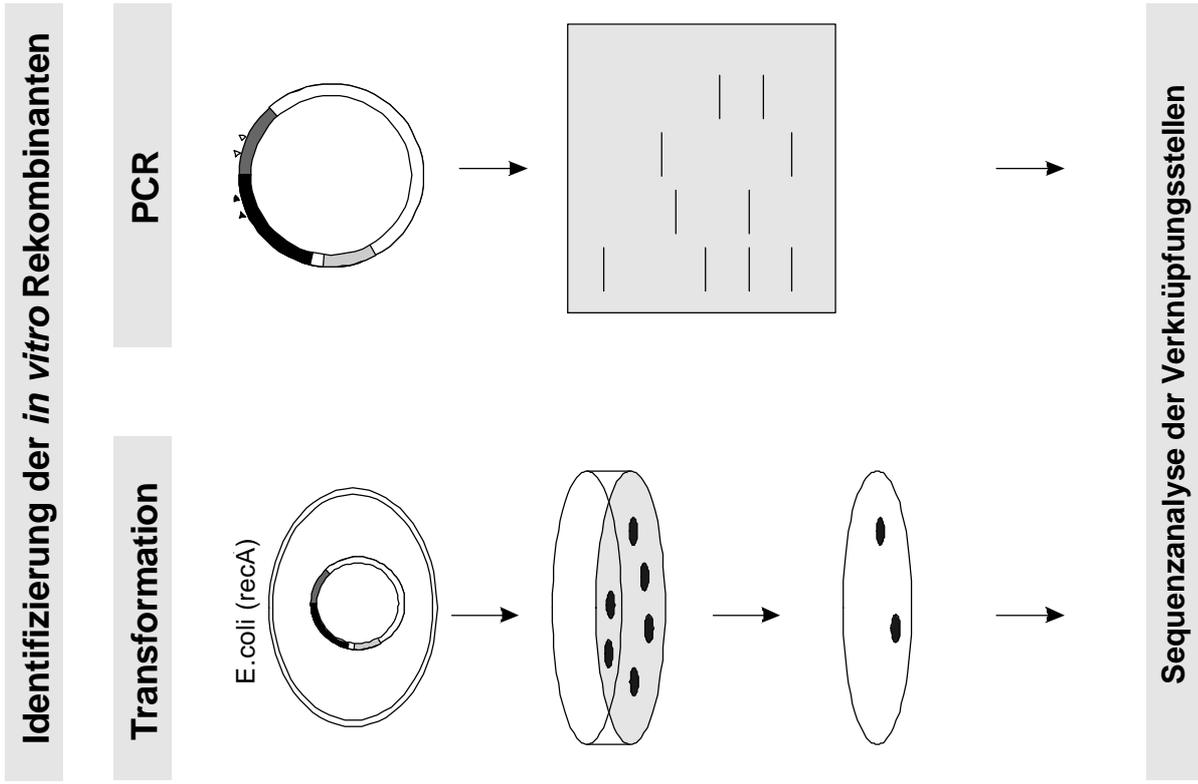


Abbildung 3: Das zellfreie Rekombinationssystem

2.1.3 Die Verteilung der Verknüpfungsstellen innerhalb der p7pBR322- und PstI-D-Sequenzen

Abbildung 5 zeigt die Verteilung und die Häufigkeit einzelner Verknüpfungsstellen innerhalb der p7pBR322-Sequenz und des PstI-D Fragmentes. Im folgenden werden die Verknüpfungen zwischen dem linken Ende des PstI-D Fragmentes und dem EcoRI-linearisierten p7pBR322-Plasmid linksterminale Verknüpfungen genannt, Verknüpfungen zwischen dem rechten Ende von p7pBR322 (nt. 6132) entsprechend rechtsterminale Verknüpfungsstellen. Die Sequenzen, die zu linksterminalen Verknüpfungen führten, sind in Abbildung 5 mit schwarzen Sternchen gekennzeichnet, die Sequenzabschnitte, die zu rechtsterminalen Verknüpfungen führen, mit weißen Sternchen.

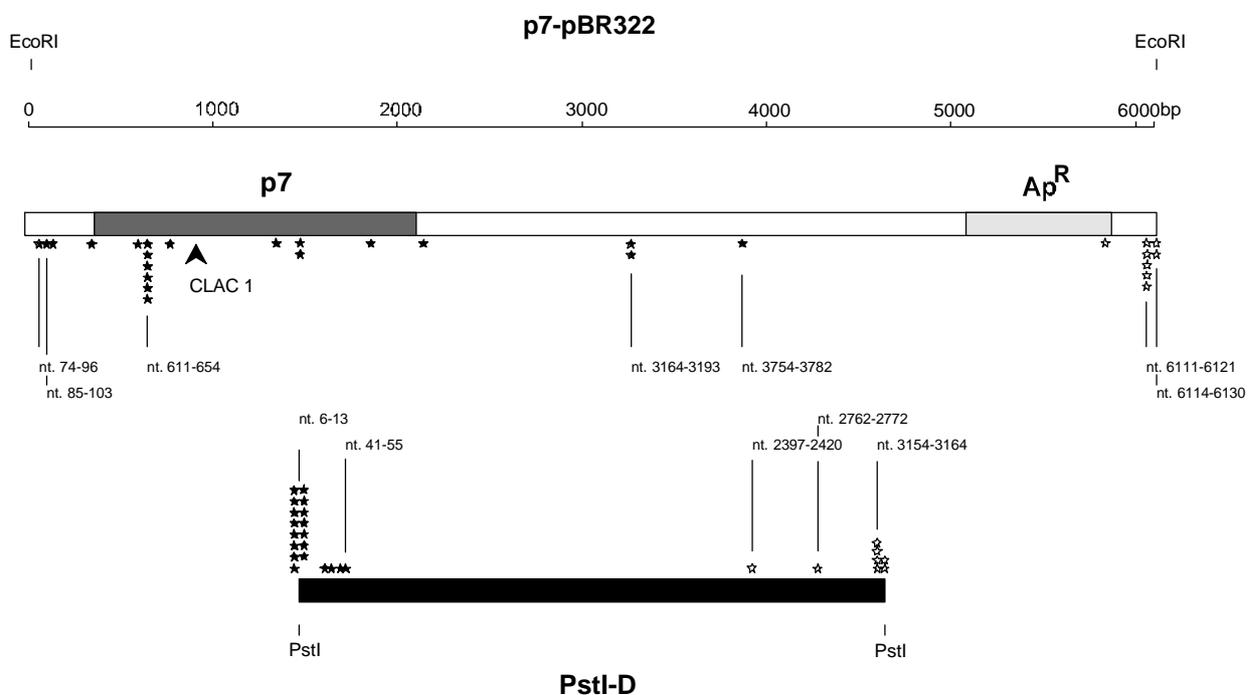


Abbildung 5: Verteilung der Verknüpfungsstellen innerhalb der p7pBR322-Sequenz (oben) und innerhalb des PstI-D Fragments (unten).

Die p7-Präinsertionssequenz ist durch eine dunkelgraue, das Gen für die Ampicillinresistenz (Ap^R) durch eine hellgraue Farbe angedeutet. Die Position, die der Verknüpfungsstelle zwischen viraler und zellulärer DNA in der Tumorzelle CLAC1 entspricht, ist durch eine Pfeilspitze markiert. Schwarze Sternchen repräsentieren kurze Sequenzhomologien, die den linken Terminus des PstI-D Fragments mit p7pBR322 verknüpfen, weiße Sternchen symbolisieren Verknüpfungsstellen zwischen dem linken Terminus von p7pBR322 und PstI-D. Jedes Sternchen an einer gegebenen Position zeigt die Häufigkeit an, mit der die entsprechende Sequenz in *in vitro* Rekombinanten gefunden wurde. Für einige der Positionen sind die Sequenzkoordinaten der p7-Sequenz (Jessberger et al., 1989) und des Ad12-PstI-D Fragments (Sprengel et al., 1994) angegeben. (Vgl. auch mit Abbildung 11a/b). Die Sequenzen des PstI-D Fragments und des p7pBR322-Plasmids mit der genauen Lage aller Verknüpfungsstellen sind auch in Anhang C und D wiedergegeben.

Die miteinander rekombinierenden Sequenzabschnitte waren nicht gleichmäßig über die p7pBR322 und PstI-D Sequenzen verteilt. Innerhalb des p7pBR322 Plasmides lagen sie nicht nur in der p7-Präinsertionssequenz, sondern auch im pBR322-Rückgrat. Dennoch lag eine bemerkenswerte Konzentration innerhalb der p7 Sequenz vor. Eine weitere Häufung von an der Reaktion beteiligten Sequenzhomologien lag am Ende des pBR322 Plasmides (nt. 6111-6130). Auch Nukleotide am rechten Ende des PstI-D Fragmentes waren häufig an der Bildung von Verknüpfungsstellen beteiligt. Am häufigsten jedoch waren Nukleotide des linken Terminus des PstI-D Fragmentes an der Bildung von Verknüpfungsstellen beteiligt. Verknüpfungen traten nicht nur zwischen der Präinsertionssequenz p7 und dem viralen PstI-D Fragment auf, sondern auch zwischen PstI-D und pBR322 Sequenzen. Offensichtlich waren nicht allein Sequenzmotive innerhalb der Präinsertionssequenz p7 für das Knüpfen einer Verbindungsstelle verantwortlich. Vielmehr schienen terminale Sequenzen den Ort der Verknüpfung zu bestimmen. Um dieses näher zu untersuchen, wurden mit dem Programm FINDPATTERNS genauere Analysen angefertigt.

2.1.4 Die Enden der DNA Fragmente bestimmen den Ort der Rekombination

Abbildung 6 zeigt eine häufig gefundene rekombinante Verknüpfungsstelle. Die Reaktion ist ganz offenbar von kurzen Sequenzhomologien zwischen terminalen Nukleotiden des PstI-D Fragmentes und einem Abschnitt innerhalb der p7pBR322 Sequenz (~Nt. 830-838) geleitet worden. Die gefundenen Rekombinanten mit dieser *junction site* sind dabei nicht durch Kontamination re-isoliert worden, da die rechtsterminale Verknüpfungsstelle in diesen Rekombinanten stets unterschiedlich war.

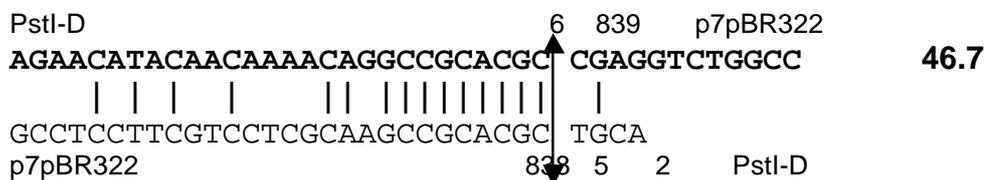


Abbildung 6: Eine häufig isolierte (linksterminale) Verknüpfungsstelle, gefunden z.B. in der Rekombinante rec 46.7. Zur Erläuterung siehe auch Bildunterschrift zu Abbildung 4. Die deletierten Nukleotide des PstI-D Fragments entsprechen dem 3'-Überhang des PstI-D Fragments.

Den Ort der linksterminalen Verknüpfung bestimmen offenbar die terminalen Nukleotide des PstI-D Fragmentes. Dies ist besonders deutlich bei der oben beschriebenen Verknüpfung, trifft aber auch auf jede andere gefundene

linksterminale Verknüpfung zu (Vgl. Abb. 11a/b). Sucht man nach kurzen, zu den terminalen Nukleotiden (nt.1-60) des PstI-D-Fragmentes homologen Sequenzabschnitten innerhalb der p7pBR322 DNA, so findet man jede im Experiment gefundene linksterminale Verknüpfungsstelle (wie z.B. in Abbildung 7). Bei dem überwiegenden Teil der sequenzierten linksterminalen Verknüpfungsstellen lag die eine beteiligte *short sequence homology* sogar innerhalb der ersten zehn linksterminalen Nukleotide des PstI-D Fragmentes. Nur in einigen wenigen Fällen waren weiter innen liegende Sequenzabschnitte an der Bildung der *junction site* beteiligt (Abbildung 11a, rec 49.42, 45.1).

Eine Voraussetzung für das Verknüpfen des adenoviralen PstI-D Fragmentes mit dem linearisierten p7pBR322 Plasmid im Rekombinationssystem sind also kurze Sequenzabschnitte innerhalb der p7pBR322-Sequenz, die homolog zu dem (linken) Terminus von PstI-D sind. Umgekehrt sind aber bisher keine Rekombinanten beschrieben, deren linksterminale Verknüpfungsstelle sich durch eine Verknüpfung zwischen dem linken Terminus von p7pBR322 und homologen Sequenzen innerhalb des PstI-D Fragmentes beschreiben ließen. Offenbar stehen für diese Reaktion nur wenige und weniger geeignete Homologien zur Verfügung, wie in Abbildung 9 exemplarisch gezeigt ist.

Der Nukleotidsequenz unmittelbar am 5'-Ende des PstI-D Fragmentes kommt offenbar eine Schlüsselrolle bei der Bildung der linksterminalen Verknüpfung zu. Sie bestimmt durch das Suchen nach einer kurzen homologen Zielsequenz im Partnermolekül den Ort der Rekombination mit. Während aber die eine der interagierenden kurzen Sequenzhomologien am Ende eines Moleküls liegt, kann die andere kurze Sequenzhomologie mehrere Kbp von einem DNA-Ende entfernt liegen (vgl. Abb. 5). Das Ausmaß der Deletion in den *in vitro* Rekombinanten richtet sich nach der Position der interagierenden kurzen Sequenzhomologien; so sind in dem einen Fragment stets nur wenige Basenpaare deletiert, im anderen können jedoch mehrere Kbp deletiert sein.

Es sei angemerkt, daß es in höher aufgereinigten Fraktionen keinen Hinweis auf eine extensive Nukleaseaktivität gibt, da die linearen Fragmente während der Inkubation mit den Proteinsuspensionen bemerkenswert stabil sind (Wronka, 1997).

Abbildung 8: Anzahl an kurzen Sequenzabschnitten in p7pBR322, die homolog zu den linksterminalen Nukleotiden der einzelnen PstI-Fragmente sind. Im oberen Teil sind jeweils die ersten zehn linksterminalen Nukleotide jedes PstI-Fragments aufgeführt (ohne die Nukleotide des Einzelstrangüberhanges).

```

PstI-A      GCTAAGGCCT
  B         CCGCGGAAGC
  C         ATTAGATAGG
  D        GGCCGCACGC
  E         CAGCTAGCTC
  F         CACAATGCTC
  G         GAAAAAAAAAC
  H         GTAATAATAC
  I         TGTATGACCG
  J         TAAGACAGGC
  K         GTTTTGATCC
  L         CTGAATTTAC
  M         TTTACAGTGC
  N         AGCCACTGTC
  O         AATGACAAAC
  P         TTATGGGGTC
  Q         GTCCAATAAC
  R         GCCCTAAACC

```

PstI-Fragment	Länge, Bp	Anzahl der <i>short sequence homologies</i> (zwei Fehlpaarungen erlaubt)
A	5341	3
B	4975	2
C	3583	1
D	3169	13
E	2672	4
F	1755	2
G	1629	2
H	1613	2
I	1493	1
J	1298	1
K	1290	1
L	1125	1
M	879	0
N	842	2
O	837	1
P	661	0
Q	554	2
R	409	6

GCTGTCAAACATGAG -3'
CGACAGTTTGTACTCTTAA-5'
 : linker Terminus von p7pBR322

1. CATGAGAATT
2. ACATGAGAAT
3. AACATGAGAA
4. AAACATGAGA
5. CAAACATGAG
6. TCAAACATGA
7. GTCAAACATG
8. TGTCAAACAT
9. CTGTCAAACA

1	CATGAGAATT	
2,473:	ATCAC catgggaata GTGCT mis=2	: Sequenzen innerhalb des PstI-D Fragments
2	ACATGAGAAT	
2,472:	AATCA ccatgggaat AGTGC mis=2	
2,933:	TCCTT acatgggcat CTTGC mis=2	
3	AACATGAGAA	
501:	CCCAT aacatcagga GCAGA mis=2	
900:	CCAAC atcatgaaaa CAGCA mis=2	
2,471:	AAATC accatgggaa TAGTG mis=2	
5	CAAACATGAG	
2,838:	TGCG caaaaattgag GAATG mis=2	
7	GTCAAACATG	
2,638:	CCATT gacaaaagatg CAAAC mis=2	
8	TGTCAAACAT	
2,637:	CCCAT tgacaaaagat GCAAA mis=2	
9	CTGTCAAACA	
3,048:	CATAC ctggcaaaact GGGAT mis=2	
3,115:	ACAAA ctgttagaca GAGCA mis=2	

Abbildung 9: Suche nach kurzen Sequenzabschnitten innerhalb des PstI-D Fragments, die homolog zu Nukleotidsequenzen des linken Endes von p7pBR322 sind und die die gleiche Orientierung haben. Angewendet wurde das Programm FINDPATTERNS aus dem GCG-Paket. Die Sequenzen, nach denen im PstI-D Fragment gesucht wurde (1.-9.) und ihre Lage in p7pBR322, sind im oberen Teil der Abbildung angeführt, die Ergebnisse der Suche im unteren Teil. Fehlpaarungen sind durch Fettschrift hervorgehoben. Alle gefundenen möglichen Paarungen wiesen mindestens zwei Fehlpaarungen auf.

6132 p7pBR322
 5`-AATTCTTGAAGACGAAAGGG-----
 AAGAACTTCTGCTTTCCC-----

1 AATTCTTGAA
 2 ATTCTTGAAG
 3 TTCTTGAAGA
 4 TCTTGAAGAC
 5 CTTGAAGACG
 6 TTGAAGACGA
 7 TGAAGACGAA
 8 GAAGACGAAA
 9 AAGACGAAAG

1 AATTCTTGAA
 172: GTATA aattc**tt**aaa CAATC mis=1
 421: ACTTG aattc**tg**gaa TAACA mis=1
 515: AGCAG aa**a**ttc**tt**gaa GTCGC mis=1
 1,495: TTCC a**tt**tt**tt**gaa AAGAC mis=2
 1,640: CATAG a**tt**tt**tt**gac TTTT mis=2
 2,400: CCTAA a**tt**tt**tt**gaa GGT**T** mis=1
 3,077: GCAGC a**at**g**ct**tgga AGAAA mis=2

2 ATTCTTGAAG
 173: TATAA attc**tt**aa**ac** AATCT mis=2
 422: CTGA attc**tg**ga**at** AACAA mis=2
 516: GCAGA a**at**ct**tt**ga**ag** TCGCA mis=1
 2,401: C**T**AAA a**tt**tt**tt**ga**ag** G**T**TA mis=1

3 TTCTTGAAGA
 174: ATAAA tt**ct**tt**aa**aca ATCTG mis=2
 423: TTGAA tt**ct**g**ga**ata ACAAG mis=2
 517: CAGAA a**tc**ttg**aa**gt CGCAA mis=2
 1,276: ATATT tt**ct**tt**gt**aca CGCTG mis=2
 1,497: TCCAT t**tt**tt**tt**gaaa GACTG mis=2
 2,278: ATATT tt**ct**tt**ta**aaa ATCAC mis=2
 2,402: TAAA t**tt**tt**tt**ga**ag** TTTAG mis=2

4 TCTTGAAGAC
 518: AGAAA t**ct**ttg**aa**gt**c** GCAAT mis=1
 901: CAACA t**ca**tg**aa**aac AGCAG mis=2
 1,277: TATTT t**ct**tt**gt**acac GCTGC mis=2
 2,110: ATCGC t**ct**tt**ca**at**ac** CAGTT mis=2

5 CTTGAAGACG
 519: GAAAT c**tt**g**aa**gt**cg** CAATT mis=1
 1,278: ATTTT c**tt**g**ta**ca**cg** CTGCC mis=2
 1,467: GAAGC c**tt**ca**aa**ac**g** TGTAC mis=2

6 TTGAAGACGA
 520: AAATC t**tg**aa**gt**cg**c** AATTA mis=2

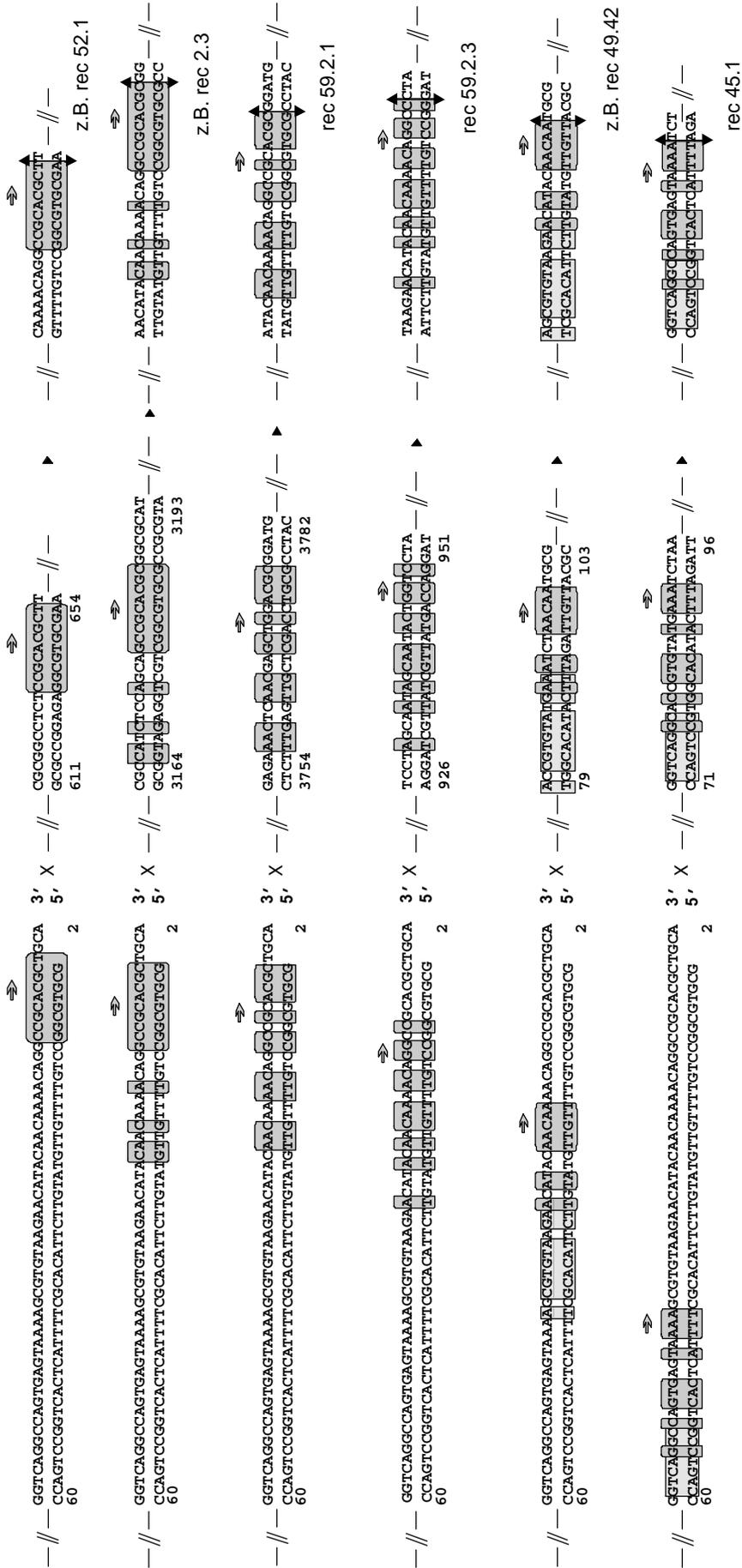
7 TGAAGACGAA
 521: AATCT t**ga**ag**tc**g**ca** ATTAG mis=2

8 GAAGACGAAA
 522: ATCTT g**aa**g**tc**g**caa** TTAGG mis=2
 1,304: CGCA a**aaa**acg**aaa** GGTGG mis=2
 3,085: GCTTG g**aa**g**aaa**aaa ACCTT mis=2

9 AAGACGAAAG
 1,305: GGCAA a**aa**acg**aaa**g GTGGC mis=1
 1,892: GGAGA a**gg**ac**aaa**g TCTAC mis=2

gefunden in rec 52.1

Abbildung 10: Suche nach kurzen Sequenzhomologien innerhalb des PstI-D Fragments, die homolog zu Nukleotidsequenzen am rechten Ende des p7pBR322-Plasmides sind und die gleiche Orientierung haben. Benutzt wurde das Programm FINDPATTERNS aus dem GCG-Paket. Die Sequenzen, nach denen im PstI-D Fragment gesucht wurde (1.-9.) und ihre Lage in p7pBR322, sind im oberen Teil der Abbildung angeführt, die Ergebnisse der Suche im unteren Teil. Fehlpaarungen sind durch Fettschrift hervorgehoben.



Verknüpfungsstelle innerhalb des rekombinanten Moleküls

korrespondierende Sequenz-homologie in p7BR322

PstI-D (nt. 2-60)

Abbildung 11a: linkerterminale Verknüpfungsstellen

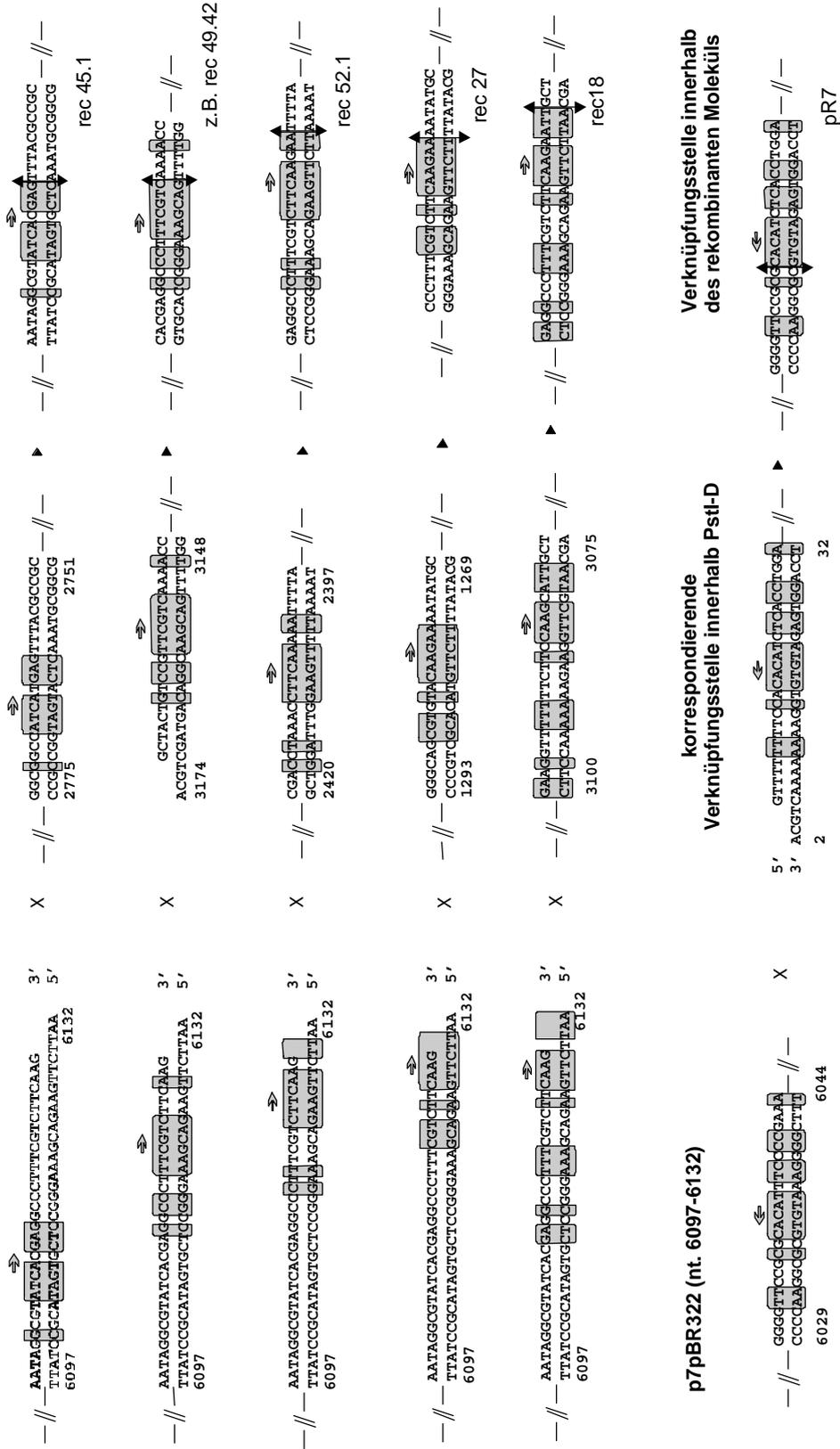


Abbildung 11b: rechtsterminale Verknüpfungsstellen

zu Abbildung 11: Beispiele linksterminaler (a) und rechtsterminaler (b) Verknüpfungsstellen einiger *in vitro* Rekombinanten und der korrespondierenden Sequenzen innerhalb p7pBR322 und des PstI-D Fragments.

Die Verknüpfungsstellen in den Rekombinanten sind durch Pfeile mit zwei Spitzen gekennzeichnet. Die kurzen Sequenzhomologien sind durch graue Kästchen hinterlegt, leicht versetzte Homologien in den Beispielen rec 45.1 und rec 49.42 sind durch kleinere und hellere Kästchen angedeutet. Die Orientierung der kurzen Sequenzhomologien wird durch graue Pfeile angezeigt.

Sucht man nach kurzen Sequenzhomologien zwischen terminalen Nukleotiden aller PstI-Fragmente des Ad12 Genoms und der p7pBR322 Sequenz, so findet man mit Abstand die meisten Homologien zwischen dem (linken) Terminus des PstI-D Fragmentes und p7pBR322 (Abbildung 8). Die Art der Verknüpfung ist jedoch ähnlich, auch wenn andere PstI-Fragmente eingesetzt werden. So zeigt Abbildung 11b die Verknüpfungsstelle zwischen p7pBR322 und dem PstI-G Fragment. Auch hier treten kurze Sequenzhomologien und Deletionen der terminalen Nukleotide auf. Das gehäufte Auftreten von kurzen, zum Terminus von PstI-D Fragment homologen Sequenzen innerhalb der p7pBR322 Sequenz ist sehr wahrscheinlich der maßgebliche Grund, warum vor allen anderen PstI Fragmenten des Ad12 Genoms das PstI-D Fragment mit der höchsten Frequenz in den Rekombinanten gefunden wurde (Jessberger et al., 1989) (vgl. auch Abbildung 1).

2.1.5 Die rechtsterminalen Verknüpfungsstellen

Bisher ist nur auf die linksterminalen Verknüpfungsstellen zwischen dem PstI-D Fragment und dem p7pBR322-Konstrukt näher eingegangen worden. Um jedoch eine Rekombinante mit dem E.coli Transfektionssystem zu amplifizieren, müssen zwei Verbindungen geknüpft worden sein. Abbildung 11b zeigt Beispiele rechtsterminaler Verknüpfungsstellen. Es finden sich die gleichen Merkmale wie an linksterminalen Verknüpfungsstellen – kurze Sequenzhomologien zwischen der rekombinanten DNA und der jeweils verdrängten DNA und Deletionen meist terminaler Nukleotide. Offenbar bestimmen auch hier kurze Nukleotidsequenzen am Terminus eines Reaktionspartners den Ort der Rekombination.

Im Fall der rechtsterminalen Verknüpfungsstellen haben offenbar die Nukleotide am rechten Ende des p7pBR322-Konstrukts den Ort der Rekombination bestimmt (Abbildung 11b), umgekehrt ist eine Verknüpfung des rechten Endes des PstI-D Fragmentes mit p7pBR322 natürlich durch die Lage des Genes für die Ampicillinresistenz (siehe Abbildung 5 und Anhang C) innerhalb p7pBR322 stark limitiert. So bleiben für diese Verknüpfungsmöglichkeit nur wenige und schwächere kurze Sequenzhomologien innerhalb p7pBR322 übrig, die zu (im E.coli Assay) nachweisbaren Rekombinanten führen. Aber auch umgekehrt, im Falle der

Verknüpfung zwischen Nukleotidsequenzen des rechten Terminus von p7pBR322 und kurzen homologen Sequenzen innerhalb des PstI-D Fragmentes stehen weniger und weniger stabile kurze Sequenzhomologien innerhalb des PstI-D Fragmentes zur Verfügung (Abbildung 10).

Für das Knüpfen der rechtsterminalen Verbindung stehen also insgesamt weniger geeignete kurze Sequenzhomologien zur Verfügung als zum Knüpfen der linksterminalen Verbindung, so wirkt dieser Schritt limitierend auf das gesamte Rekombinationssystem.

2.1.6 Die gewählten kurzen Sequenzhomologien

Wie oben bereits beschrieben, sind die Möglichkeiten zur Bildung einer rechtsterminalen Verknüpfungsstelle weitaus begrenzter als die zur Bildung einer linksterminalen Verknüpfungsstelle. Aus diesem Grund wird im folgenden zur Beschreibung der kurzen Sequenzhomologien erst auf die linksterminalen Verknüpfungsstellen eingegangen. Tabelle 1a vergleicht schematisch die gefundenen kurzen Sequenzhomologien an den linksterminalen Verknüpfungsstellen. Die Verknüpfungsstellen sind dabei danach angeordnet, wie häufig sie in verschiedenen Rekombinanten isoliert werden konnten. Offenbar ist die Bildung einer Verknüpfungsstelle dort besonders begünstigt, wo sich eine kurze – aber ununterbrochene – Homologie von mindestens sechs Basenpaaren bilden kann. In der Hälfte der aufgeführten Verknüpfungsstellen sind unmittelbar an der Verknüpfungsstelle acht oder neun Basenpaare ohne Unterbrechung homolog zur verdrängten DNA. Eine noch längere ununterbrochene Sequenz zu terminalen Nukleotiden des PstI-D Fragments ist in p7pBR322 nicht vorhanden.

Aber auch unterbrochene, dafür zum Teil ausgedehntere Homologien können als Zielsequenz genutzt werden. Die Frequenz der jeweiligen Reaktion ist aber gering. Die kurzen Sequenzhomologien an den rechtsterminalen Verknüpfungsstellen entsprechen diesem zweiten Typus von Homologien, es sind stets Homologien mit Unterbrechungen.

Tabelle 1b gibt einen schematischen Überblick über die sequenzierten rechtsterminalen Verknüpfungsstellen. Auch hier ist eine Verknüpfungsstelle häufiger als andere gefunden worden. Die tatsächlichen Stabilitäten der auftretenden kurzen Sequenzhomologien sind nicht genau abzuschätzen, aber in diesem Fall scheint nicht der Typus der Homologie den Ausschlag für die Bevorzugung dieser einen Paarung zu geben. Es fällt auf, daß diejenige Verknüpfungsstelle gehäuft nachgewiesen wurde, bei deren Bildung die wenigsten Basenpaare von p7pBR322 und dem PstI-D Fragment deletiert wurden. Das gleiche trifft zu beim Vergleich der

Tabelle 1: schematische Übersicht der Verknüpfungsstellen

1a: linksterminale Verknüpfungsstellen:

schematische Darstellung der <i>short sequence homology</i>	Anzahl der deletierten Basenpaare in p7pBR322	Anzahl der deletierten Basenpaare in PstI-D	Anzahl der deletierten Basenpaare in p7pBR322 und PstI-D	Häufigkeit	Beispiel
-----x-xxxxxxxxxx	627	5	632	6x	52-1
xx-x---x---xxxxxxxxxx	3186	5	3191	2x	2.3
x--x----xx-xxxxxxxxxx	838	5	843	2x	46.7
x-----x-xxx-xxxxxxx	1090	5	1095	2x	rec27
-----x-xx-xxxxx	99	18	117	2x	49.42
-----x--x-xxx--x-xxx	91	40	131	1x	45.1
-xxx--xxx--xx-x-xxxx	3775	5	3780	1x	59.2.1
-x---x-x-xxx-xx-xx-x	947	11	958	1x	59.2.3
--x-x-xx-----xxxxxx	301	8	309	1x	rec9
-----x-x-xxxxxxxx-x	229	5	234	1x	rec36
---x-----xx-xxxxxxx	1454	5	1459	1x	rec18



Position der Verknüpfungsstelle in den *in vitro* Rekombinanten

zu Tabelle 1a: In der ersten Spalte der Tabelle 1a sind die kurzen Sequenzhomologien (*short sequence homologies*) schematisch dargestellt. Kreuze (x) entsprechen homologen Basenpaaren, Striche (-) nicht homologen Basenpaaren.

1b: rechtsterminale Verknüpfungsstellen:

schematische Darstellung der <i>short sequence homology</i>	Anzahl der deletierten Basenpaare in p7pBR322	Anzahl der deletierten Basenpaare in PstI-D	Anzahl der deletierten Basenpaare in p7pBR322 und PstI-D	Häufigkeit	Beispiel
x-xx-xxxxxx---x-----	18	10	28	4x	49.42
xxx-xxxx-x----xxx---x-xx	0	99	99	1x	rec18
xxx-xxxx---x-----	18	414	432	1x	45.1
xx-xxxxxx----x-x----	0	774	774	1x	52.1
xxxxxx-x-xxx-----	0	1899	1899	1x	rec27

↑

Position der Verknüpfungsstelle in den *in vitro* Rekombinanten

zu Tabelle 1b: zur Erläuterung siehe Tabelle 1a.

linksterminalen Verknüpfungsstellen von rec 52.1, rec 2.3 und rec 46.7 (Tabelle 1a). Bei Verknüpfungen, die zu Verknüpfungsstellen mit ähnlichem Muster der kurzen Sequenzhomologien führen, wird offenbar diejenige begünstigt, die zum geringsten Verlust an Nukleotiden führt.

Offenbar werden kurze ununterbrochene Sequenzhomologien den unterbrochenen, und zum Teil ausgedehnteren Sequenzhomologien vorgezogen, auch wenn dies zu einer größeren Deletion führt. Beim Vergleich der Verknüpfungsstellen mit Homologien ähnlicher Stabilität fällt aber auf, daß die gehäuft gefunden wurden, die zum geringsten Verlust an Nukleotiden führten.

Allen Verknüpfungsstellen ist gemeinsam, daß das erste Basenpaar der kurzen Sequenzhomologien, welches unmittelbar an die Verknüpfungsstelle in den *in vitro* Rekombinanten angrenzt, immer homolog zu dem entsprechenden verdrängten Basenpaar ist. Das zweite Basenpaar dagegen muß offenbar schon nicht mehr homolog zum entsprechenden verdrängten Basenpaar sein (rec 59.2.3 und rec 36 in Tabelle 1a, rec 49.42 in Tabelle 1b).

2.1.7 Zwei DNA-Enden als Voraussetzung für die Rekombinationsreaktion ?

Bei der Rekombinationsreaktion des zellfreien Systems bestimmen die terminalen Nukleotide den Ort der Rekombination, indem mit ihrer Hilfe im Partnermolekül nach kurzen homologen Sequenzen gesucht wird. Wie oben geschildert, ist das wichtigste gefundene Kriterium die Stabilität der kurzen Sequenzhomologien. Zudem scheint aber auch die Anzahl der in beiden Partnermolekülen verlorenen Nukleotide von Gewicht zu sein.

Dies ist ein Indiz dafür, daß die Suche nach kurzen Sequenzhomologien am freien DNA Ende des Partnermoleküls beginnt und von dort aus fortschreitet.

Im Standardrekombinationsassay wird neben dem PstI-D Fragment linearisiertes p7pBR322-Plasmid eingesetzt. Es sind nur drei Rekombinanten dokumentiert, die nach Einsatz von zirkulärem p7pBR322-Plasmid isoliert worden sind (Jessberger et al., 1989). In den entsprechenden Ansätzen ist das zirkuläre Plasmid mit Rohextrakten (Fraktion I; Abbildung 2) aus Zellkernen von BHK21 Hamsterzellen inkubiert worden. Unter diesen Bedingungen wird ein beachtlicher Anteil der zirkulären Plasmide linearisiert (Jessberger et al., 1989). Es ist also nicht möglich zu unterscheiden, ob zirkuläres oder linearisiertes p7pBR322 zur Entstehung der Rekombinanten geführt hat. Im übrigen sind diese drei Rekombinanten leider nicht näher charakterisiert oder sequenziert worden. Mit gereinigten Kernextrakten konnten bei Einsatz von zirkulärem p7pBR322 keine Rekombinanten nachgewiesen werden.

2.1.8 Das Schicksal der Einzelstrangüberhänge

Die Substrate der Rekombinationsreaktion werden linearisiert eingesetzt; das PstI-D Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease PstI aus einem entsprechenden Vektor ausgeschnitten, das p7pBR322-Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoRI linearisiert. Beide Restriktionsendonukleasen erzeugen durch ihren Schnitt Einzelstrangüberhänge, EcoRI einen 5'-Einzelstrangüberhang, PstI einen 3'-Überhang. In Abbildung 11b wird deutlich, daß in einigen Fällen Nukleotide des 5'-Überhanges in der Rekombinante erhalten bleiben (rec52.1, rec27), in einem Fall bleibt sogar die Information des kompletten 5'-Überhanges erhalten (rec18).

Auf der anderen Seite ist anhand der vorhandenen Sequenzen nicht eindeutig festzustellen, ob Nukleotide der 3'-Überhänge des PstI-D Fragments in den Rekombinanten erhalten bleiben können. An einer Verknüpfungsstelle erscheint dies möglich (rec 52.1, Abb. 11a). Allerdings kann in diesem Fall nicht unterschieden werden, ob das entsprechende Nukleotid unmittelbar an der Verknüpfungsstelle (ein T) aus der Sequenz des 3'-Überhanges des PstI-D Fragments oder aus der p7pBR322-Sequenz stammt. Daher ist es in diesem Fall auch nicht möglich, die Position der Verknüpfungsstelle innerhalb der Rekombinante exakt zu bestimmen.

Es fällt weiter auf, daß einige Nukleotide des 3'-Überhanges in einigen Fällen Teil der gefundenen kurzen Sequenzhomologien hätten sein können (rec 52,1, rec 2.3, rec 59.2.1, Abb. 11 a und Anhang B) - kurze Sequenzhomologien mit entsprechenden Mustern sind durchaus gefunden worden - aber dennoch nie in den *in vitro* Rekombinanten erhalten wurden.

Die Faktoren der verknüpfenden Aktivität können offenbar auf die Information in der Sequenz des 5'-Einzelstranges zurückgreifen, möglicherweise aber nicht auf die des 3'-Einzelstranges.

2.1.9 Die Präinsertionssequenz p7

Die Präinsertionssequenz p7 ist in *in vitro* Rekombinanten überdurchschnittlich häufig an Verknüpfungen beteiligt. Ganz offensichtlich liegen in ihr viele kurze Nukleotidsequenzen, die homolog zu den (links-)terminalen Nukleotiden des PstI-D Fragments sind. Gibt es aber noch weitere Eigenschaften dieser Präinsertionssequenz, die die Rekombination begünstigt haben könnten ?

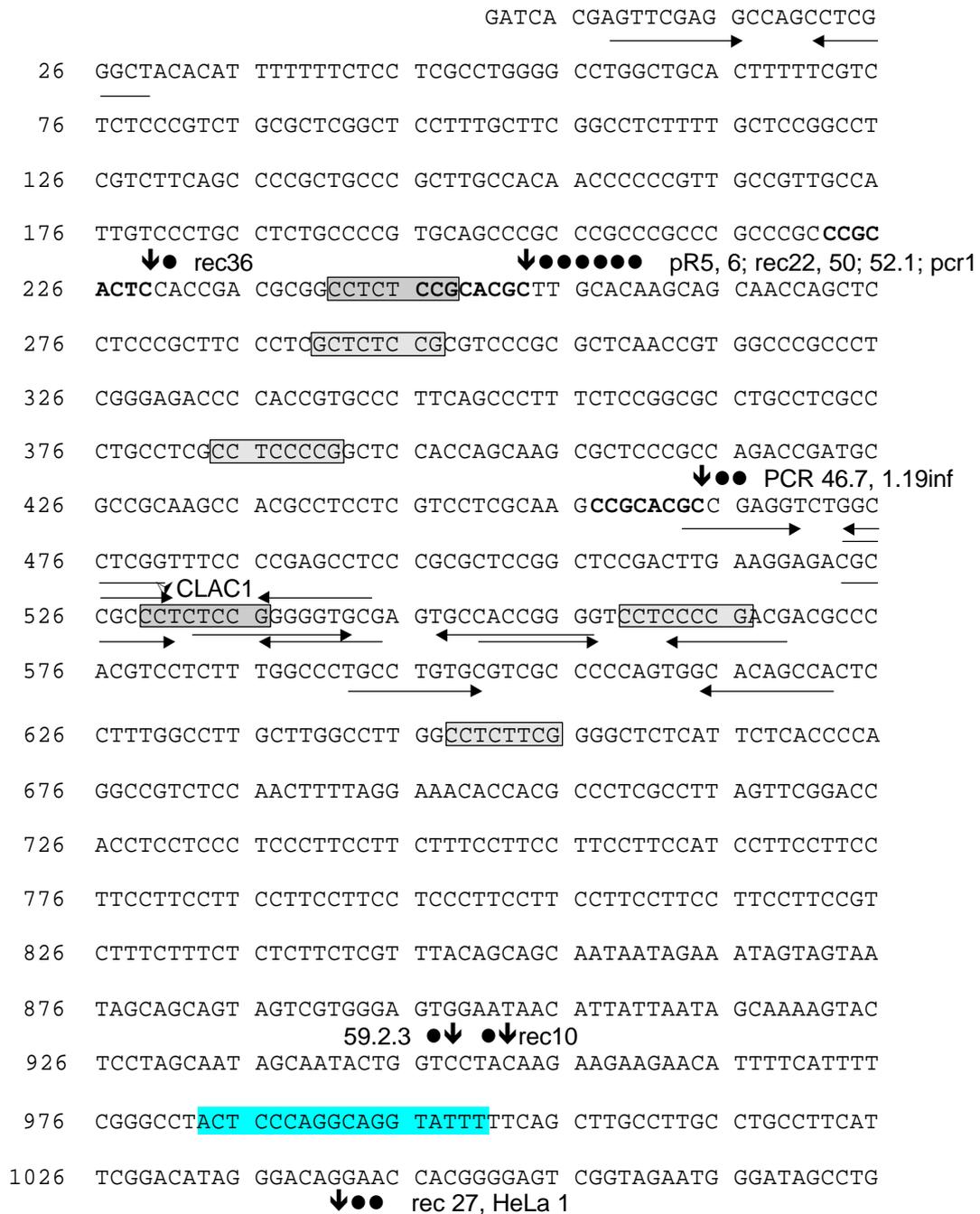


Abbildung 12: Sequenzmotive innerhalb der p7-Präinsertionssequenz.

Dargestellt sind Sequenzmotive um die ursprüngliche Integrationsstelle in der Tumorzelllinie CLAC1 (↘). Das Sequenzmotiv CCTCTCCG, das unmittelbar an der CLAC1 Insertionsstelle und in der Nähe einiger *in vitro* Verknüpfungsstellen gefunden wurde, ist grau hinterlegt. Ebenso wurden Sequenzen hervorgehoben, die nur in einer Position von diesem Motiv abwichen. Die Topoisomereschnittstelle (nt. 983-1000) ist ebenfalls grau hinterlegt. Indirekte Sequenzwiederholungen sind durch Pfeile unterhalb der Sequenz angedeutet.

Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten sind durch vertikale schwarze Pfeile markiert; die schwarzen Punkte neben diesen Pfeilen geben an, wie oft die jeweilige Verknüpfungsstelle in *in vitro* Rekombinanten nachgewiesen wurde.

Die p7-Sequenz ist bereits beschrieben worden (Jessberger et al., 1989). Dabei sind einige besondere Merkmale aufgefallen: ein Auftreten von CCTT-, CTG- und GCCC-Sequenzrepetitionen (Jessberger et al., 1989), sowie ein CCTCTCCG-Motiv, das nicht nur unmittelbar an der ursprünglichen CLAC1-Verknüpfungsstelle, sondern auch in der Nähe einiger Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten auftrat (Tatzelt, 1992, 1993). Allerdings wurde nie eine *in vitro* Verknüpfungsstelle direkt an der ursprünglichen CLAC1-Verknüpfungsstelle beobachtet (Abbildung 12), auch fehlt das CCTCTCCG-Motiv an nahezu allen Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten (Ausnahme siehe Abbildung 12).

Verschiedene Beobachtungen sind an den Verknüpfungsstellen zwischen viraler und zellulärer DNA in Ad12-transformierten Hamsterzellen und Ad12-induzierten Tumorzellen gemacht worden (Doerfler et al., 1983, Knoblauch et al., 1996, Doerfler, 1996). Dazu zählt das Auftreten von *patch homologies* zwischen Sequenzen links und rechts der Verknüpfung (zu unterscheiden von den oben beschriebenen kurzen Sequenzhomologien zwischen der DNA der Rekombinante und der jeweils verdrängten DNA). An verschiedenen *in vivo* gefundenen Verknüpfungsstellen sind invertierte Sequenzwiederholungen gefunden worden, die *stem loop* Strukturen ausbilden könnten. In der Nähe von Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten konnten aber weder signifikante *patch homologies* zwischen viraler DNA und dem p7pBR322 Vektor noch erwähnenswerte indirekte Sequenzwiederholungen gefunden werden.

Wohl aber fällt eine Häufung von invertierten Sequenzwiederholungen unmittelbar an der CLAC1-Verknüpfungsstelle auf (Abbildung 12). Innerhalb der p7 Präinsertionssequenz liegt auch die *consensus*-Sequenz einer DNA Topoisomerase II (Spitzner und Muller, 1988). Die gehäuft auftretenden Motive CTT und ACTT sind bevorzugte Schnittstellen der eukaryontischen Topoisomerase I (Been and Champoux, 1984). Allerdings ist in den fraktionierten Kernextrakten ab Fraktion V keine Topo I Aktivität mehr nachweisbar (Fechteler, 1996). Diese Sequenzmotive könnten aber die Wahl des ursprünglichen Integrationsortes mitbestimmt haben.

Im zellfreien System bestimmen die Nukleotidsequenzen an den Termini der Fragmente den Rekombinationsort, indem sie im Partnermolekül nach kurzen Sequenzhomologien suchen. Die terminale Nukleotidsequenz (5`-GCCGCACGC-3`) des PstI-D Fragments, die an den meisten linksterminalen Verknüpfungsstellen gefunden wurde (an 15 von 20 untersuchten linksterminalen Verknüpfungsstellen) ist sehr GC-reich. Kurze homologe Sequenzen im Partnermolekül müssen daher ebenfalls GC-reich sein. Und dies ist der klare Vorteil der p7-Präinsertionssequenz gegenüber dem pBR322-Plasmid und anderen zufällig ausgewählten Hamstersequenzen: sie besitzt nicht nur einen höheren

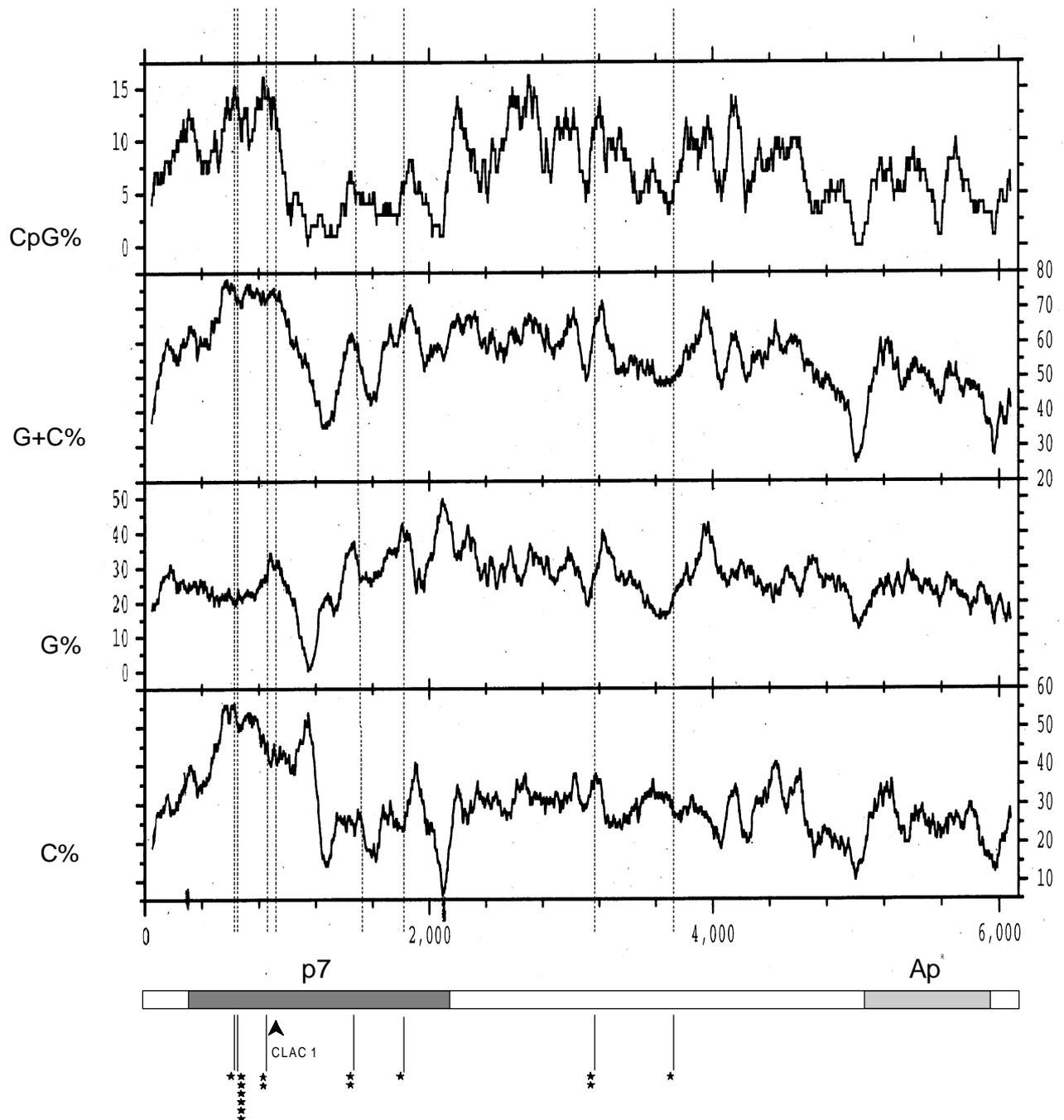


Abbildung 13: Verteilung der CpG-Dinukleotide, des GC%-Gehaltes, der Cytosin- und Guaninbase in der p7pBR322-Sequenz.

Im unteren Teil der Abbildung ist schematisch die Lage der p7-Präinsertionssequenz und des Genes für die Ampicillinresistenz (Ap^R) innerhalb der p7pBR322-Sequenz angedeutet. Die feinen vertikalen Linien geben die Positionen der in den *in vitro* Rekombinanten gewählten kurzen Sequenzhomologien an. Aufgeführt sind hier nur die Verknüpfungsstellen, an denen die äußersten linksterminalen Nukleotide des PstI-D Fragments (5'-GCCGCACGC-3') beteiligt sind. Die Anzahl der Sternchen unter der jeweiligen vertikalen Linie gibt die Häufigkeit an, mit der die entsprechende Verknüpfungsstelle in den Rekombinanten gefunden wurde. Die Profile wurden mit den Programmen *Window* und *Statplot* erstellt, dabei wurden folgende Parameter gewählt: *window size*: 100 nt; *shift increment*: 3 nt.

durchschnittlichen GC%-Gehalt (60,1%) als das pBR322-Plasmid (53,7%), sondern sie umschließt auch eine etwa 500 Bp große Region mit extrem hohem GC%-Gehalt (>70%) und mit hohem CpG-Gehalt (Abbildung 13). Die Wahrscheinlichkeit, in dieser GC-reichen Region eine kurze Sequenzhomologie zu der GC-reichen terminalen Sequenz des PstI-D Fragments zu finden ist ungleich höher, als in der GC-ärmeren zweiten Hälfte der p7-Präinsertionssequenz oder in pBR322. So liegen 9 von 15 der Verknüpfungen der GC-reichen terminalen Nukleotidsequenz des PstI-D Fragments mit p7pBR322 in der etwa 500 Bp großen GC-reichen Region der p7-Sequenz, 14 von 15 Verknüpfungen liegen in Sequenzabschnitten mit einem GC%-Gehalt von über 60%. In Abbildung 13 sind nur die Verknüpfungsstellen aufgelistet, an denen die äußersten terminalen Nukleotide des PstI-D Fragments beteiligt sind. In wenigen Fällen (z.B. rec 45.1, rec 49.42) sind auch weiter innen liegende Nukleotidsequenzen an der Reaktion beteiligt. Diese Sequenzen sind GC-ärmer und sind nicht auf die GC-reichen Abschnitte der Präinsertionssequenz angewiesen. Tatsächlich liegen die entsprechenden Verknüpfungsstellen auch in der pBR322-Sequenz.

Offensichtlich ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens kurzer Sequenzhomologien in einer Zielsequenz abhängig von der Basenzusammensetzung der Zielsequenz. Je ähnlicher die Basenzusammensetzung der Zielsequenz der Basenzusammensetzung der terminalen Nukleotidsequenz ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von kurzen homologen Abschnitten, und desto höher ist die Rekombinationsfrequenz

2.1.10 Kontrollen zum E.coli Transfektionssystem

Das Transfektionssystem birgt den Nachteil, daß die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, daß E.coli aktiv - sei es auch nur teilweise - die Rekombinationsvorgänge beeinflussen kann. Einerseits könnte E.coli die gesamte Reaktion katalysieren, andererseits könnten im Bakterium Vorgänge abgeschlossen werden, die von den Proteinfractionen initiiert worden sind. Diese beiden Möglichkeiten erscheinen nach einer Reihe von Experimenten aber unwahrscheinlich.

I. Für die Transformation wurden stets nur rekombinationsdefiziente ($recA^-$) Bakterien verwendet. Dieser Status wurde direkt nach Erhalt der Bakterienstämme und in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

II. Als Kontrolle wurden bei jeder Transformation auch PstI-D-Fragmente gemeinsam mit pBR322-p7-DNA transfiziert, die vorher nicht mit aktiven Proteinfractionen inkubiert worden waren („Wasserkontrolle“). Niemals ist hier ein positives Signal gefunden worden (Tabelle 2).

III. Weiterhin wurden auch keine positiven Signale beobachtet, nachdem PstI-D-Fragmente und pBR322-p7-DNA *getrennt* mit Proteinextrakten inkubiert worden waren und anschließend in E.coli transfiziert worden waren (Tabelle 2).

Die überzeugendste Kontrolle war jedoch der von E. coli unabhängige Nachweis der Rekombinanten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion.

Inkubationsbedingungen	Amp ^R - positive Kolonien	eindeutig identifizierte Rekombinante
p7pBR322 x EcoRI und PstI-D zusammen transfiziert in HB101/LM1035	~25000	0
p7pBR322 x EcoRI und PstI-D ohne Inkubation mit Proteinextrakt	8721	0
p7pBR322 x EcoRI und PstI-D getrennt mit Proteinfractionen inkubiert, dann gemeinsam transfiziert	1352	0
Inkubation mit Fr. II	~7800	7
Fr. IV	~2000	2
Fr. V	~6350	3
Fractionen Glycerolgradient	~15000	0

Tabelle 2: Kontrollen zum E. coli Transfektionssystem und Übersicht über die in dieser Arbeit mit dem E. coli-Assay isolierten *in vitro* Rekombinanten

2.1.11 Das PCR-Nachweisverfahren

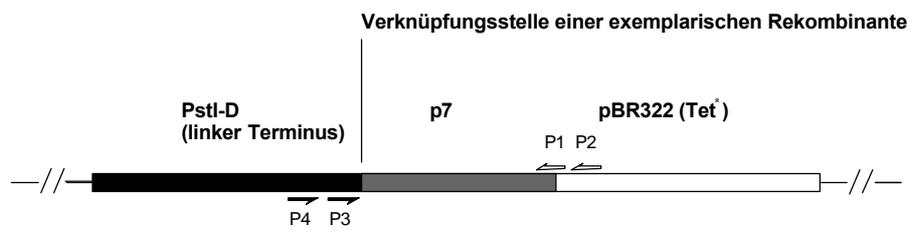
Die gewählten PCR-Primer lagen derart, daß die Sequenzen linksterminaler Verknüpfungsstellen innerhalb der Rekombinanten amplifiziert werden konnten. Sie lagen zum einen am linken Terminus des PstI-D Fragments, zum anderen innerhalb der p7-Präinsertionssequenz oder innerhalb des Genes der Tetracyclinresistenz des pBR322-Rückgrates (Abbildung 14). Das PstI-D Fragment wurde für die Experimente, bei denen die Rekombination mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden sollte, aus einem tetracyclinresistenzgenfreien Vektor ausgeschnitten.

Eine weitere mögliche Ursache für Artefakte während der PCR-Reaktion ist ein Strangtausch oder -sprung der Taq-Polymerase (Odelberg et al., 1995; Pääbo et al., 1990). Daher wurden umfangreiche Kontrollexperimente unternommen, in denen linearisiertes p7pBR322 und PstI-D Fragment eingesetzt wurden. Die Mengenverhältnisse entsprachen dabei den Standardbedingungen des

Rekombinationsassays. In keinen dieser Versuche ist mit den gewählten Primern ein PCR Produkt nachgewiesen worden.

Ein Nachteil des PCR Nachweisverfahrens gegenüber dem E.coli-Transfektionsassay ist, daß nicht die gesamte Rekombinante isoliert werden kann, sondern nur die Sequenz um eine Verknüpfungsstelle amplifiziert wurde. Da es nur eine limitierte Anzahl von Verknüpfungsmöglichkeiten gab, war die Gefahr einer Kontamination durch bereits gefundene Rekombinanten besonders zu beachten. Alle Negativkontrollen sind jedoch stets negativ geblieben. Die Verknüpfungsstelle der recPCR2 ist zudem nur einmal - Jahre zuvor von einem anderen Mitarbeiter - in einem anderen Laborraum isoliert worden. Kontamination ist hier also sehr unwahrscheinlich.

(a) Position der Primer für das PCR-Nachweisverfahren



(b) mit PCR nachgewiesene Verknüpfungsstellen

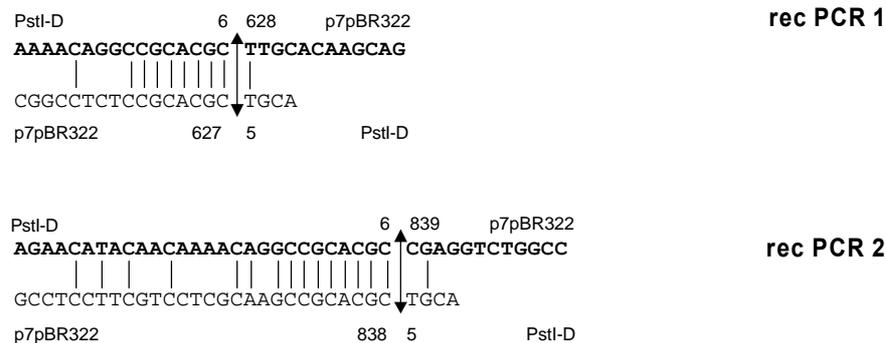


Abbildung 14: (a) Design des PCR-Nachweissystems. P3, P4 bzw. P1, P2 sind die Primer, die auf dem Ad12 PstI-D Fragment bzw. in der p7-Sequenz oder innerhalb des Genes der Tetracyclinresistenz (Tet^R) liegen. (b) Beispiel von Verknüpfungsstellen, die mit dem PCR-Nachweissystem amplifiziert worden sind. Der obere Strang repräsentiert die rekombinante DNA, der untere Strang die verdrängte PstI-D- oder p7pBR322-Sequenz. Die genaue Position der Verknüpfungsstelle ist durch einen doppelköpfigen Pfeil bezeichnet. Homologien zwischen rekombinanter und verdrängter DNA sind durch vertikale Linien dargestellt.

Die Verknüpfungsstellen (Abbildung 14), die durch das PCR Verfahren amplifiziert wurden, waren zuvor schon mit Hilfe des E.coli Transfektionssystem gefunden worden. Sie zeigen die typischen, oben beschriebenen Merkmale. Es war also möglich, mit zwei unterschiedlichen Nachweisverfahren die gleichen Arten von Rekombinanten bzw. Verknüpfungsstellen zu isolieren.

2.1.12 Die Verwendung von Kernextrakten aus humanen Zellen

Für das *in vitro* Rekombinationssystem wurden normalerweise fraktionierte Kernextrakte aus BHK21 Hamsterzellen verwendet (Jessberger et al., 1989; Tatzelt et al., 1992, 1993; Dissertation K. Fechteler, 1996). In einigen Versuchen wurden allerdings Kernextrakte aus humanen HeLa-Zellen verwendet. Die Präparation der Extrakte erfolgte dabei nach dem gleichen Protokoll.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch links- und rechtsterminale Verknüpfungsstellen einer Rekombinante, die nach Einsatz von HeLa-Kernextrakten erhalten wurde. Die mit humanen Extrakten gewonnenen Rekombinanten wiesen ganz offenbar die gleichen Merkmale auf wie die mit Hamsterextrakten gewonnenen. Die Rekombinationsfrequenz blieb ebenfalls ähnlich.

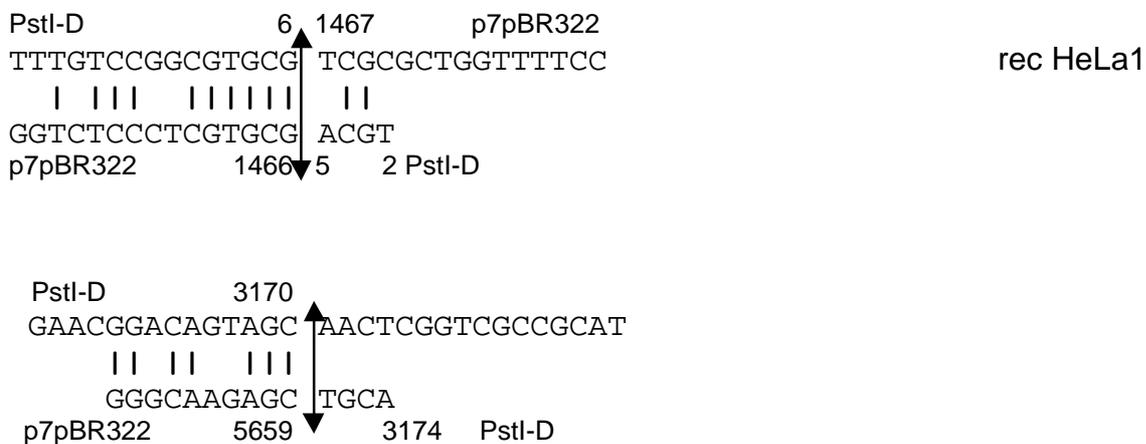


Abbildung 15: Linksterminale (oben) und rechtsterminale (unten) Verknüpfungsstelle einer *in vitro* Rekombinante, die nach Einsatz von Kernextrakten aus humanen Zellen isoliert worden war.

2.2 Zur Fraktionierung der rekombinationsaktiven Proteine

Das beschriebene zellfreie Rekombinationssystem ist verbunden mit dem E. coli-Transfektionssystem in vergangenen Arbeiten benutzt worden, um die rekombinationsaktiven Proteine in einer Serie von chromatographischen Schritten aufzureinigen (Jessberger et al., 1989; Tatzelt et al., 1993; Fechteler, 1996). Dabei sind sowohl Kernextrakte aus uninfizierten als auch aus Ad12-infizierten BHK 21 Zellen eingesetzt worden (s. Einleitung, Abbildung 2). Es gelang eine beachtliche Aufreinigung der Rekombinationsaktivität aus uninfizierten Kernextrakten bis zu Fraktion VI, die im silbergefärbten Polyacrylamidgel acht Hauptbanden aufwies und rekombinationsaktiv war (Fechteler, 1996). Doch auch in dieser am höchsten gereinigten Fraktion VI wiesen silbergefärbte Polyacrylamidgele neben den Hauptbanden noch eine Vielzahl von schwächeren Banden auf (vgl. Abb. 16, Fechteler 1996), so daß eine Identifizierung der an der Rekombinationsreaktion beschriebenen Proteine bisher nicht gelang.

Zwar ließ die Vielzahl der noch in Fraktion VI enthaltenen Proteinspezies keine Charakterisierung der Rekombinationsaktivität zu, umgekehrt konnten aber bestimmte Proteine in den höher gereinigten Fraktionen nicht nachgewiesen werden, so daß deren Beteiligung an der zellfreien Reaktion unwahrscheinlich ist. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis eines Western Blot Experiments, in dem Ku70-spezifische Antikörper eingesetzt werden. Bei vergleichbaren aufgetragenen Gesamtmengen konnte zwar ein Signal in den Fraktionen I und II, nicht aber in Fraktion V nachgewiesen werden. Das Ku-Heterodimer ist eine Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase, die in Säugern maßgeblich an der DNA-Doppelstrangbruchreparatur beteiligt ist (vgl. Abschnitt 1.4).

2.2.1 Reinigung der Kernextrakte über einen Glyceringradienten

Mit Hilfe eines Glyceringradienten sollte bestimmt werden, ob die Rekombinationsaktivität in einem Komplex („IRAC“ – *integrative recombination active complex*, Fechteler, 1996) vereint ist, und ob die so gewonnenen rekombinationsaktiven Fraktionen in ihrer Zusammensetzung mit denen der rein chromatographischen Reinigung in Einklang stehen.

Bei Einsatz des Glyceringradienten wurden die Kernextrakte aus BHK21-Zellkernen zunächst ebenfalls über eine Sephacryl S-300 Gelfiltrationssäule gereinigt. Fraktion II wurde dann aber nicht auf die Resource S-Kationenaustauschersäule geladen, sondern direkt auf die Resource Q-Anionenaustauschersäule (Fraktion IV*).

Insgesamt wurden von Fraktion IV' jeweils 50-200 µg Protein in 500 µl Volumen auf den Gradienten aufgetragen. Dieser wurde in einem SW41 Polyallomerröhrchen aus 5,5 ml 30% igem und 5,5 ml 10% igem Glycerin (jeweils in Standardpuffer D) aufgebaut.

Der beladene Gradient wurde für 20-60 h bei 35.000 UpM und 2°C zentrifugiert. Nach Abschluß des Zentrifugenlaufes wurde das Röhrchen zum Austropfen von unten mit einer Kanüle angestochen und es wurden Fraktionen von jeweils etwa 350 µl aufgefangen.

Trotz umfangreicher Versuchsreihen konnte in keiner Fraktion eines Glycerolgradienten Rekombinationsaktivität nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 2). So ist entweder die Aktivität durch die experimentelle Prozedur vollkommen zerstört worden, oder die notwendigen Komponenten sind durch die Zonensedimentation voneinander getrennt worden. In diesem Fall würde es sich bei der Rekombinationsaktivität nicht um einen festassoziierten Komplex handeln.

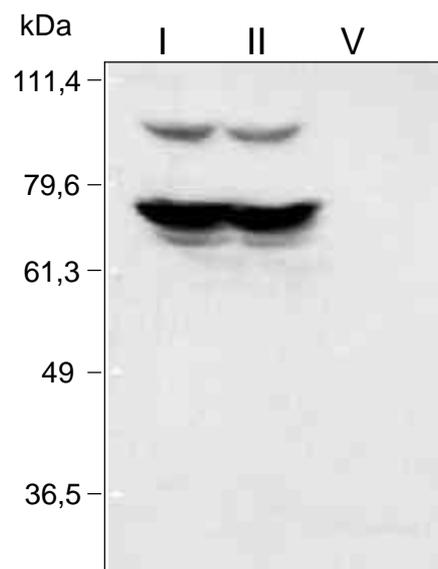


Abbildung 16: „Western Blot“ mit Antikörpern gegen humanes Ku70.

Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als primärer Antikörper wurde anti-Ku70 (1:200) eingesetzt. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet. Anhand von Markerproteinen konnten die Molekulargewichte der Antigene bestimmt werden.

Zusammenfassung I: Eigenschaften der *in vitro* Rekombinanten

- Die Verknüpfung des PstI-D-Fragments mit p7pBR322 im zellfreien System ist abhängig vom Auftreten kurzer Sequenzhomologien
- Mit fraktionierten Kernextrakten tritt kein einfaches end-to-end-joining auf
- Die entsprechenden *short sequence homologies* in p7pBR322 und dem PstI-D Fragment liegen auf unterschiedlichen Molekülen, sind aber zueinander wie *short direct repeats* orientiert
- Eine der interagierenden kurzen Sequenzhomologien liegt stets unmittelbar am oder sehr nahe an einem DNA-Ende, die zweite kann mehrere Kbp von einem DNA-Ende entfernt sein
- Links- und rechtsterminale Verknüpfungsstellen sind einander so ähnlich, daß der gleiche Mechanismus für deren Ursprung angenommen werden kann
- Die Reaktion ist nicht konservativ: Nukleotide der zwischen interagierenden kurzen Sequenzhomologien liegenden Sequenz und die Nukleotide einer der Sequenzhomologien sind im rekombinanten Molekül deletiert
- Die Nukleotide der 5'-Überhänge bleiben in einigen Rekombinanten erhalten
- Keine zusätzlichen Nukleotide im Bereich der Verknüpfungsstelle; Insertionen sind nicht beobachtet worden
- Keine Sequenzmodifikationen oder Amplifikationen; die Sequenz auf der einen Seite der Verknüpfungsstelle stammt vom PstI-D Fragment, die Sequenz auf der anderen von p7pBR322
- Kein offensichtliches gemeinsames Sequenzmotiv an den verschiedenen Verknüpfungsstellen

- Die Frequenz der Reaktion hängt von verschiedenen Faktoren ab:

Ununterbrochene kurze Sequenzhomologien wurden häufiger an Verknüpfungsstellen gefunden als ausgedehntere, aber unterbrochene kurze Sequenzhomologien; die längsten ununterbrochenen Sequenzhomologien hatten eine Länge von neun Basenpaaren, ausgedehntere, nicht unterbrochene Homologien waren im PstI-D Fragment und p7pBR322 nicht vorhanden, doch ausgedehntere, unterbrochene Sequenzhomologien deuten an, daß der Rekombinationsapparat auch ausgedehntere Sequenzen umfassen kann; bei Sequenzhomologien mit ähnlicher Anordnung der homologen Nukleotide sind diejenigen Kombinationen begünstigt, die zum geringsten Verlust an Nukleotiden führen. Offenbar beginnt die Suche nach kurzen homologen Nukleotidsequenzen am DNA Ende

- Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens kurzer Sequenzhomologien in einer Zielsequenz ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Zielsequenz. Je ähnlicher die Basenzusammensetzung der Zielsequenz der Basenzusammensetzung der terminalen Nukleotidsequenz ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von kurzen homologen Abschnitten und desto höher ist die Rekombinationsfrequenz

Zusammenfassung II: Stärken und Schwächen des *in vitro* Rekombinations-systems

Stärken:

- Mit dem E.coli Transfektionssystem kann die vollständige Rekombinante isoliert werden; unabhängig davon konnten die gleichen Verknüpfungsstellen mit der Polymerasekettenreaktion nachgewiesen werden
- Mit dem E.coli Transfektionssystem werden beide Verknüpfungsstellen der Rekombinante isoliert; die Kombination zweier Verknüpfungsstellen ist eine innere Kontrolle gegen Reisolierung einer bereits gefundenen Verknüpfungsstelle
- p7pBR322 und das PstI-D Fragment haben insgesamt eine hohe Sequenzvariabilität; Sequenzerfordernisse der Rekombinationsreaktion können daher besonders gut untersucht werden

Schwächen:

- Die Rekombinationsfrequenz des zellfreien Systems ist niedrig
- Für das üblicherweise benutzte E.coli Transfektionssystem müssen zwei Verknüpfungsstellen gebildet werden; die entstehenden Kombinationen sind einerseits eine Absicherung gegen Reisolierung bereits gefundener Rekombinanten, die nachweisbare Rekombinationsfrequenz jedoch sinkt. Die Selektion auf eine Ampicillinresistenz schließt bestimmte Verknüpfungsstellen vom Nachweis aus; für die Bildung rechtsterialer Verknüpfungsstellen stehen insgesamt weniger kurze Sequenzhomologien zur Verfügung als für die Bildung linksterialer Verknüpfungsstellen
- Die Reaktion findet zwischen kurzen Sequenzhomologien statt; ausgedehnte, nicht unterbrochene Homologien werden bevorzugt gewählt; perfekte Homologien dieser Art mit einer Länge von über neun Basenpaaren stehen allerdings in p7pBR322 und dem PstI-D Fragment nicht zur Verfügung
- Wahrscheinlich begünstigt auch der Abstand der kurzen Sequenzhomologien vom DNA Ende die Rekombinationsfrequenz; die *short sequence homologies* innerhalb p7pBR322 liegen aber nicht in der Nähe der Termini

2.3 Lokalisierung von Ad2- und Ad12-Sequenzen in den Genomen Ad2- und Ad12- transformierter Zellen

2.3.1 Das Profil des BHK 21 - Genoms

Die BHK 21-Zelllinie wurde 1961 von Nierenzellen des syrischen Hamsters (*Mesocricetus auratus*) abgeleitet (Macpherson and Stoker, 1962). Das aus der genomischen DNA dieser Zelllinie gewonnene analytische Profil ist in Abbildung 17 wiedergegeben.

Die CsCl-Profile vieler Nagerspezies weisen charakteristische Unterschiede auf, so daß die Analyse von CsCl-Profilen schon als schnelle und robuste Methode zur Erforschung der Nagetiersystematik herangezogen wurde (Douady et al., 2000). Im Gegensatz zu vielen anderen Nagerprofilen besitzt das BHK 21-Profil keine augenfälligen Satelliten, kryptische Satelliten können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Vergleicht man die Asymmetrie der Profile der einzelnen Nagerspezies

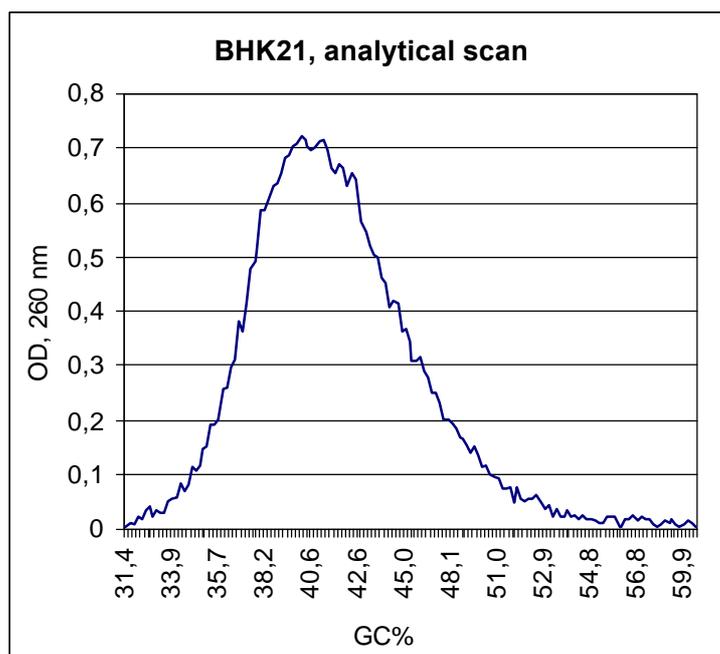


Abbildung 17: Die Schwebedichtegradientenzentrifugation in einer analytischen Ultrazentrifuge wurde wie in Abschnitt 5.6.1 beschrieben durchgeführt (Thiery et al., 1976). Um jeden beliebigen Punkt auf der Abszisse (Abstand r von der Rotationsachse) in die korrespondierende Schwebedichte ρ umzurechnen, wurde folgende Formel benutzt: $\rho = \rho_m - (\omega^2/2\beta_0) \cdot (r_m^2 - r^2)$. Dabei bezieht sich der tiefgestellte Buchstabe m auf den Schwebedichtenmarker, ω ist die Kreisgeschwindigkeit [s^{-1}], und für β wurde der Wert $1.195 \cdot 10^9 \text{ cm}^5 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-2}$ (Ifft et al., 1961) eingesetzt. Die DNA des Phagen 2c ($\rho_m = 1,742 \text{ g/cm}^3$; Szybalski 1968) wurde als Schwebedichtenmarker benutzt. Die Formel $\text{GC}\% = (\rho - 1,66) / 0,00098$ (Schildkraut et al., 1962) wurde abschließend angewendet, um die den Schwebedichten entsprechenden GC%-Werte zu berechnen.

miteinander, so scheint das Profil der BHK21-Zelllinie asymmetrischer als das anderer Spezies wie Maus (*Mus musculus*) oder Ratte (*Rattus norvegicus*), aber

weitaus weniger asymmetrisch als das menschliche Profil zu sein (vgl. auch Abbildung 25) (Douady et al., 2000; O. Clay, persönl. Mitteilung). Die Asymmetrie eines Profils entspricht der Heterogenität der zugrundeliegenden DNA-Sequenz.

2.3.2 Präparative Schwebedichtegradientenzentrifugation

Ziel der im folgenden dargestellten Experimente war, herauszufinden, ob die Integration adenoviraler DNA auf bestimmte Isochorenfamilien beschränkt ist. Dazu wurde zunächst die genomische DNA verschiedener Ad12- und Ad2-transformierter Zelllinien schonend präpariert, so daß die isolierten DNA-Fragmente eine Größe von durchschnittlich etwa 145 kBp aufwiesen (Abbildung 18). Die Größe der Fragmente wurde mit Pulsfeldgelelektrophorese bestimmt. Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden nun nach ihrer Schwebedichte in Caesiumchlorid-Gleichgewichtsgradienten aufgetrennt (VTi 90, 35000 UpM, 20°C, 22-24h). Die Fraktionen der Gradienten wurden nach dem Lauf von oben her gesammelt und die DNA-Konzentration jeder Fraktion im Photometer bestimmt. Durch Auftragen der DNA-Konzentration gegen die Fraktionsnummer konnte das Profil des jeweiligen Genoms graphisch dargestellt werden. Da die Fraktionen von oben her gesammelt wurden, nimmt die Schwebedichte bzw. der GC%-Gehalt der in den Fraktionen enthaltenen DNA mit

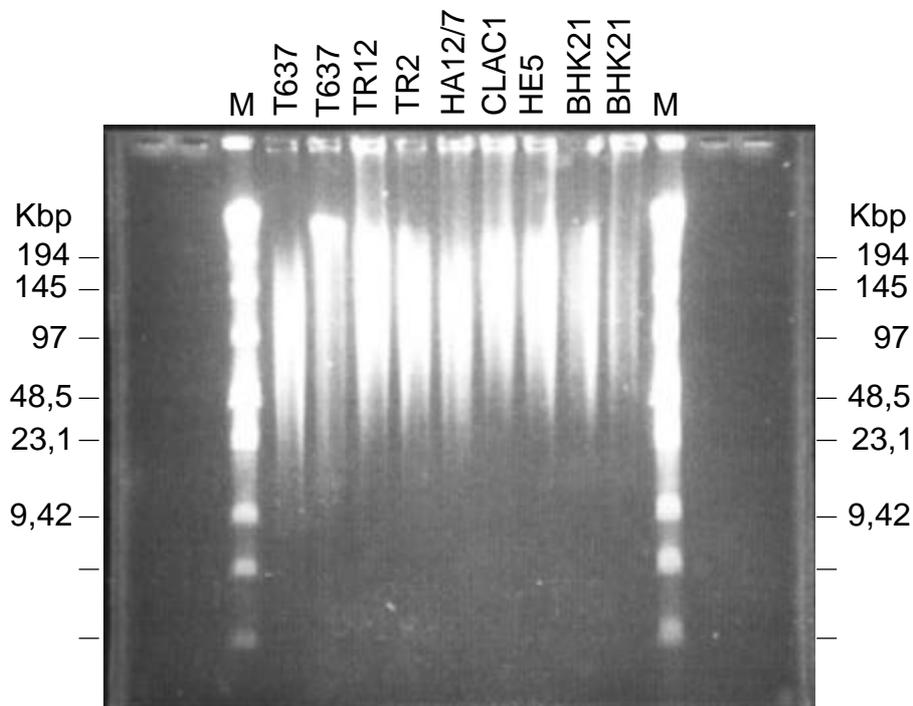


Abbildung 18: Pulsfeldgelelektrophorese der in präparativen Schwebedichtegradienten eingesetzten genomischen DNA. Als Marker wurde eine Mischung aus lambda DNA-HindIII Fragmenten und Lambda-Konkatameren eingesetzt (NEB Biolabs).

wachsender Fraktionszahl zu. Die DNA-Verteilung im Caesiumchlorid-Schwebedichtegradienten konnte in einer analytischen Ultrazentrifuge auch direkt

bestimmt werden. Das so erhaltene Profil konnte mit dem Profil aus dem präparativen Lauf überlagert werden, so daß jeder Fraktion eine Schwebbedichte bzw. ein GC%-Wert zugeordnet werden konnte.

In den in Abb. 19-27 wiedergegebenen Experimenten wurden neutrale Caesiumchloridlösungen für die präparativen Gradienten verwendet. In einer Reihe von Experimenten wurden auch alkalische Caesiumchloridlösungen (in 300 mM NaOH, 10 mM EDTA) verwendet, um die Wechselwirkungen zwischen adenoviraler und zellulärer DNA zu minimieren. In diesen Ansätzen gelang es jedoch nicht, ein DNA-Profil mit dem Photometer aufzunehmen. Offensichtlich löste die NaOH-Lösung einen Stoff entweder aus dem Zentrifugenröhrchen (Polyallomer, Beckman) oder aus dem Fraktionssammler, der auch im Bereich 220-280 nm absorbierte und so das Absorptionsprofil der DNA überlagerte. Daher sind die Ergebnisse der alkalischen Gradienten hier nicht aufgeführt.

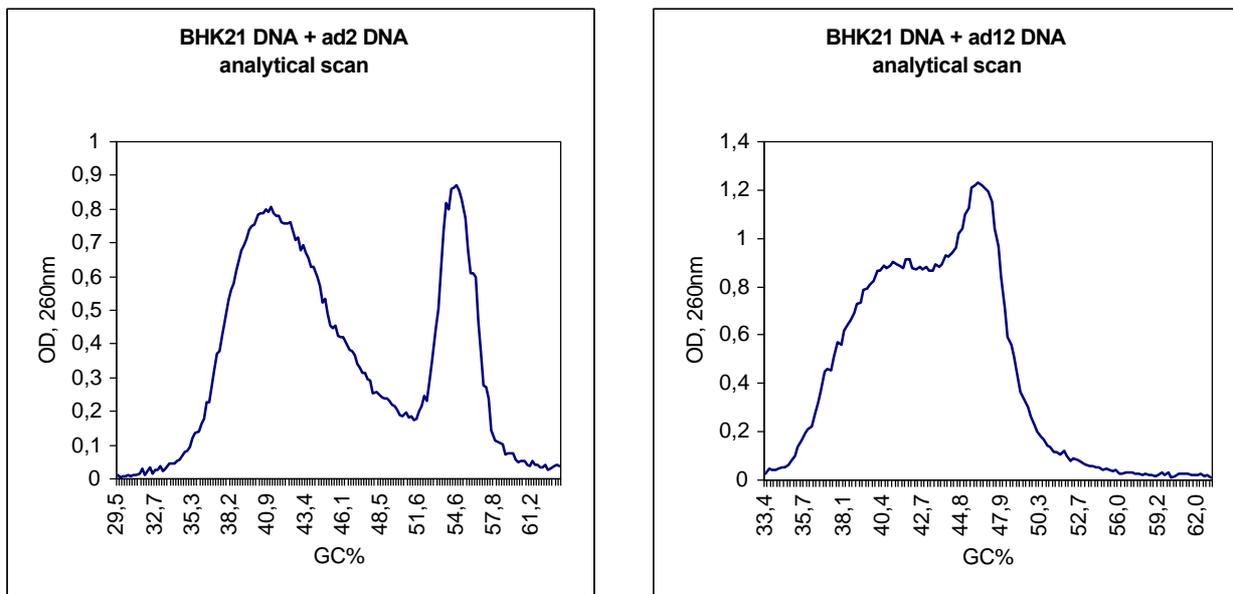


Abbildung 19: Profile von BHK 21 DNA in der analytischen Ultrazentrifuge gemischt mit (a) DNA von Adenovirus Typ 2 DNA und (b) DNA von Adenovirus Typ 12 DNA. Die Formeln für die Berechnung der Schwebbedichte an jedem Punkt der Abszisse und für die Berechnung der entsprechenden GC%-Werte sind in der Beschriftung zu Abbildung 17 angegeben.

2.3.2.1 Kontrollexperimente

Genomische DNA aus BHK 21 Zellen wurde mit Ad12 oder Ad2 DNA gemischt und als Probe in der analytischen Ultrazentrifuge eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 gezeigt. In beiden Fällen erkennt man das BHK 21-Profil, überlagert von scharfen Spitzen der adenoviralen DNA-Signale. Die so experimentell bestimmten mittleren GC%-Werte der Adenovirus Typ 2 und Typ 12 DNA betragen 54,6% und 46,1%. Die aus den Sequenzen abgeleiteten GC%-Werte betragen

55,2% (Roberts et al., 1986) und 46,5 % (Sprengel et al., 1994). Genomische und adenovirale DNA wurden auch durch präparative isopyknische Zentrifugation fraktioniert; in den in Abbildung 20 wiedergegebenen Experimenten wurde DNA aus BHK 21 Zellen jeweils mit acht Genomequivalenten Ad2 DNA oder mit acht Genomequivalenten Ad12 DNA (Fanning and Doerfler, 1976) eingesetzt. Die Ergebnisse der präparativen gleichen denen der analytischen Gleichgewichtszentrifugation. Sie zeigen, daß adenovirale und zelluläre DNA auch unter neutralen Bedingungen effektiv getrennt werden können.

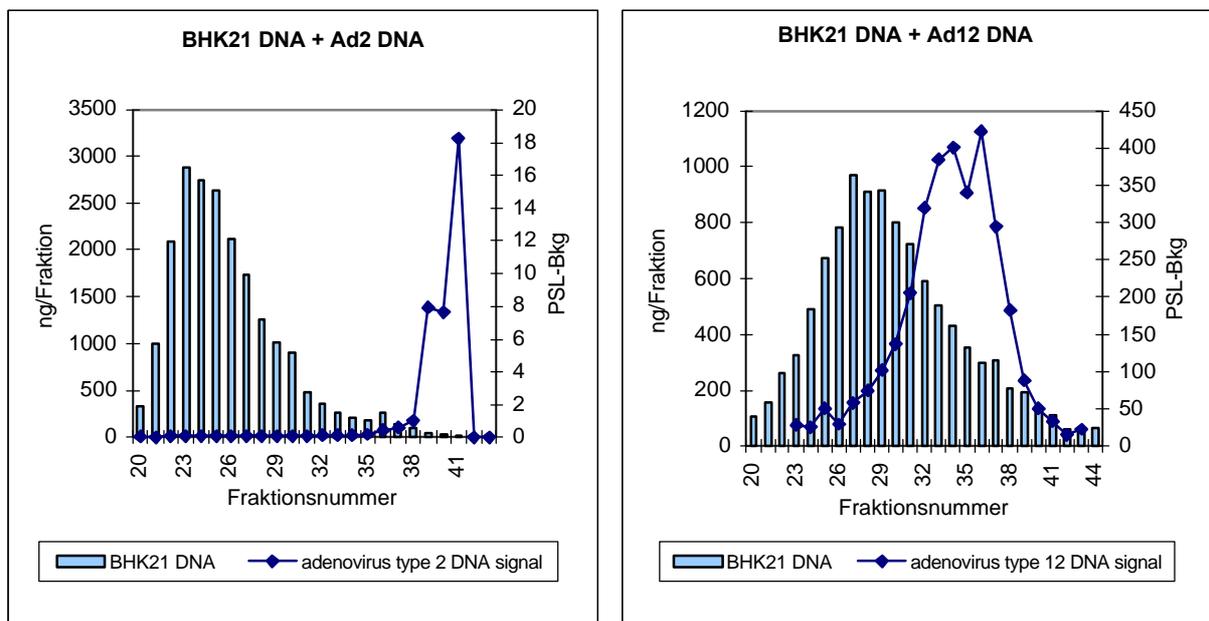


Abbildung 20: Präparative Schwebelichtgradientenzentrifugation von BHK 21 DNA gemischt mit acht Genomequivalenten Ad2 DNA (a) und gemischt mit acht Genomequivalenten Ad12 DNA.

2.4 Kompositionelle Fraktionierung der Genome einiger Ad12- oder Ad2-transformierter Zelllinien und von Ad12-induzierten Tumorzelllinien

Um zu testen, in welche Fraktion des Wirtsgenoms die virale DNA integriert war, wurde die genomische DNA verschiedener Ad12- oder Ad2-transformierter Zelllinien (Tabelle 3) durch Schwebeschichtgradientenzentrifugation fraktioniert; anschließend wurde die DNA der einzelnen Fraktionen entweder durch das „Dot Blot“-Verfahren auf Nylonmembranen fixiert und mit einer geeigneten Sonde hybridisiert oder durch die Polymerasekettenreaktion mit adenoviruspezifischen Primern untersucht. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Analyse der Zelllinie T637 (Strohl et al., 1970) und ihrer revertanten Zelllinien TR2 und TR12 (Groneberg et al., 1978; Groneberg and Doerfler, 1979). Die Ad12-transformierte Zelllinie T637 trägt >20 Genomequivalente des Ad12-Genoms in einem chromosomalen Lokus, die Revertanten haben die meisten integrierten Kopien viraler DNA verloren. Die Zelllinie TR12 besitzt noch 1-2 Kopien, TR2 weniger als eine Kopie des Ad12 Genoms. Der Integrationsort der adenoviralen DNA ist offensichtlich in allen drei Zelllinien gleich (Knoblauch et al., 1996).

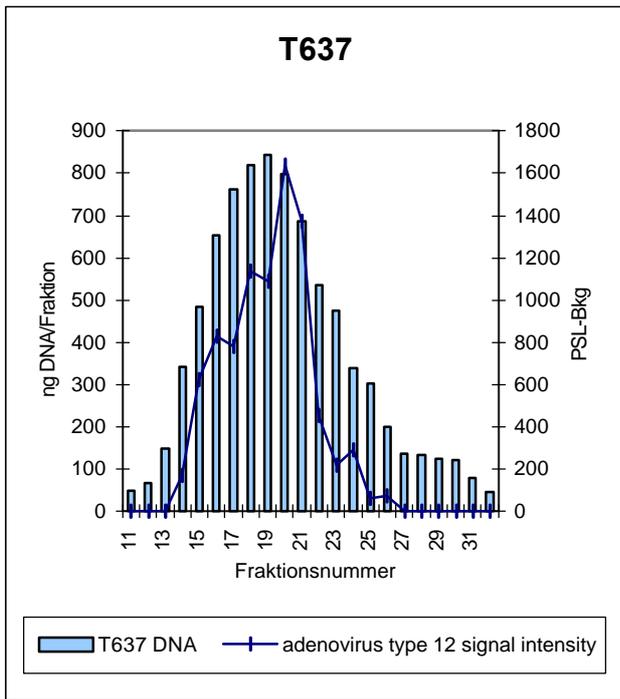
Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion konnten in vielen Fraktionen des T637-Gradienten adenoviruspezifische Signale gefunden werden (Abbildung 21). Die breite Signalintensitätskurve läßt sich durch die große Anzahl integrierter Ad12 Genomequivalente erklären. Im Vergleich zu den Gradienten, für die BHK 21 DNA mit Ad12 DNA gemischt worden war (Abbildung 20), ist jedoch das adenoviruspezifische Signal in den T637-Gradienten deutlich zu GC%-ärmeren Fraktionen verschoben. Eine Integration der viralen DNA in relativ GC%-arme Regionen bestätigt auch eine entsprechende Analyse der TR2- und TR12-Gradienten. In diesen Zelllinien ist der Großteil der integrierten viralen DNA verloren gegangen; dies äußert sich in weitaus enger verlaufenden Signalintensitätskurven (Abbildung 21 b und c). Die Abbildungen zeigen deutlich, daß in den Zelllinien TR2 und TR12 und damit auch in der Ursprungszelllinie T637 die adenovirale DNA mit DNA-Abschnitten des Wirtsgenoms verknüpft ist, die einen deutlich geringeren GC%-Gehalt als das Virusgenom haben. Dies wurde auch durch eine weitere PCR-Analyse bestätigt, in der ein Primerpaar verwendet wurde, das spezifisch für die dem Integrationsort in T637 entsprechende Präinsertionssequenz aus BHK21 Zellen ist (Abbildung 21 d). Der Gipfel dieses Signals liegt ebenfalls in deutlich GC%-ärmeren Fraktionen. Eine zelluläre Sequenz, die in der Zelllinie T637 mit adenoviraler DNA verknüpft ist, ist bereits kloniert und sequenziert worden (Knoblauch et al., 1996). Diese 5324 Bp lange bekannte zelluläre Sequenz hat einen GC%-Anteil von 36,4 % (Tabelle 4).

Name der Zelllinie	Virus	Art der Transformation oder der Tumorinduzierung	Kopienzahl pro Zelle	Transkriptions-aktivität	Literaturangaben
T637	Ad12	BHK Zellen, <i>in vitro</i>	>20	nein	Strohl et al., 1970 Knoblauch et al., 1996
TR12	Ad12	BHK Zellen, <i>in vitro</i> ; Revertante Zelllinie von T637	1-2	nein	Groneberg et al., 1978; Eick et al., 1980
TR2	Ad12	BHK Zellen, <i>in vitro</i> ; Revertante Zelllinie von T637	<1	nein	Groneberg et al., 1978; Eick et al., 1980
HA12/7	Ad12	primäre embryonale Hamsterzelle, transformiert <i>in vitro</i>	3	ja	erhalten von H. zur Hausen
CLAC1	Ad12	Injektion von CsCl-gereinigtem Ad12 in CLAC - Inzucht(hamster)stamm; Etablierung einer Zelllinie	(12)	ja	Stabel et al., 1980
T1111(2)	Ad12	Ad12-induzierter Hamstertumor	~10	ja	Lichtenberg et al., 1987
HE5	UV-inaktiviertes Ad2	LSH primäre embryonale Zellen, transformiert <i>in vitro</i>	2-3	ja	Gahlmann et al., 1982

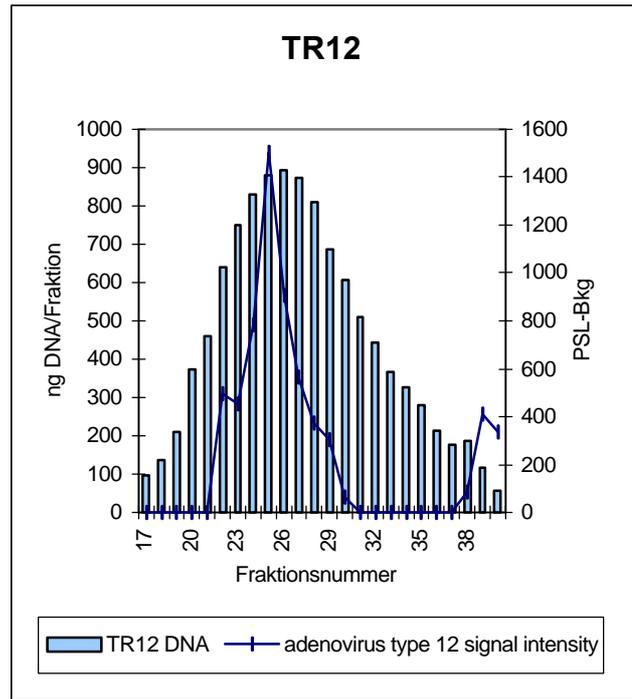
Tabelle 3: Untersuchte Ad2- und Ad12-transformierte Zelllinien und Ad12-induzierte Tumorzelllinien

Name der Zelllinie oder des Virus	Länge des Virusgenoms oder der sequenzierten Präinsertionssequenz / Bp	GC%	transkriptionelle Aktivität an der Präinsertions- sequenz	Anzahl der deletierten viralen Nukleotide
Adenovirus Typ 12 (Sprengel et al., 1994)	34125	46,5		
T1111(2) IAP	1311 ~7000	48,3 46,5	ja	64
T637 (os2), TR2, TR12	5324	36,4	nein	2
CLAC1	1768	60,1	ja	174
Adenovirus Typ 2 (Roberts et al., 1986)	35937	55,2		
HE5	840	33,6		8/10

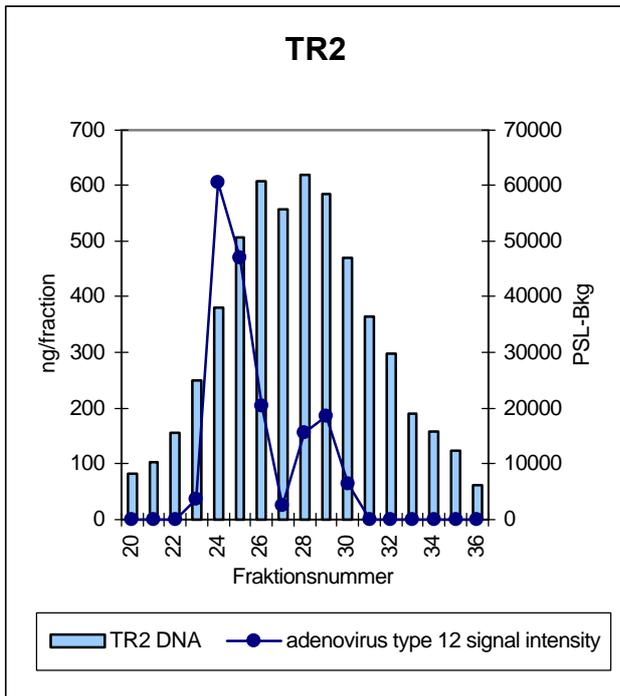
Tabelle 4: GC% Gehalt bekannter Präinsertionssequenzen. Literaturangaben siehe Tabelle 3, S. 51.



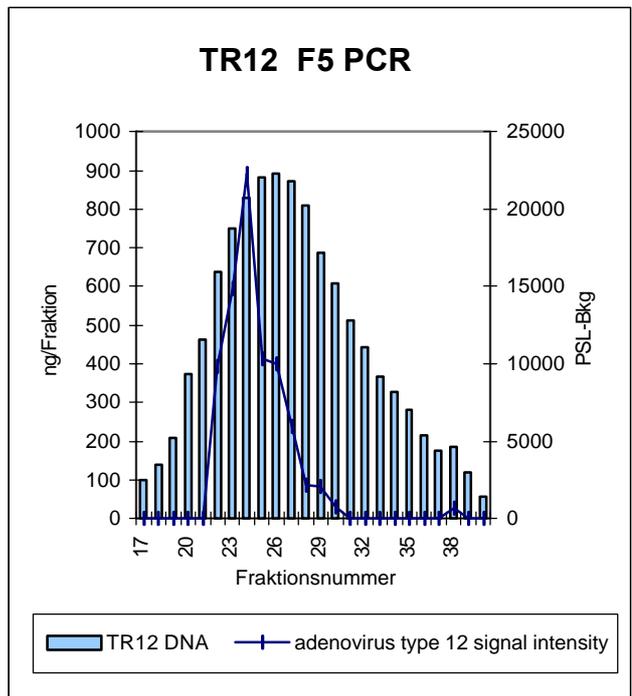
a.



b.



c.



d.

Abbildung 21: Präparative Schwebedichtegradientenzentrifugation mit genomischer DNA der Ad12-transformierten Zelllinie T637 und ihrer Revertanten TR2 und TR12. Adenovirale Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion unter Verwendung der adenovirus-spezifischen Primerpaare L1/L2 oder L3/L4 (a)-(c) oder des Paares F5-1/F5-2 nachgewiesen. Das Primerpaar F5-1/F5-2 liegt in der entsprechenden Präinsertionssequenz, die aus der Zelllinie BHK21 kloniert worden war (Knoblauch et al., 1996).

Die Zelllinie HA12/7 stammt von primären embryonalen Hamsterzellen ab, die in Zellkultur durch Ad12 transformiert worden waren (zur Hausen, 1973). Jede Zelle dieser Zelllinie trägt etwa 3-4 Genomequivalente Ad12 DNA; das Integrationsmuster der viralen DNA ist bereits früher beschrieben worden (Stabel et al., 1980). Die virale DNA konnte durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an einem chromosomalen Lokus nachgewiesen werden (Knoblauch et al., 1996). Ähnlich den T637-Gradienten ließ sich auch in vielen Fraktionen des HA12/7 Gradienten Ad12 DNA nachweisen (Abbildung 22). Und ebenso war auch hier die Intensitätskurve des adenovirusspezifischen Signals zu GC-armen Fraktionen hin verschoben.

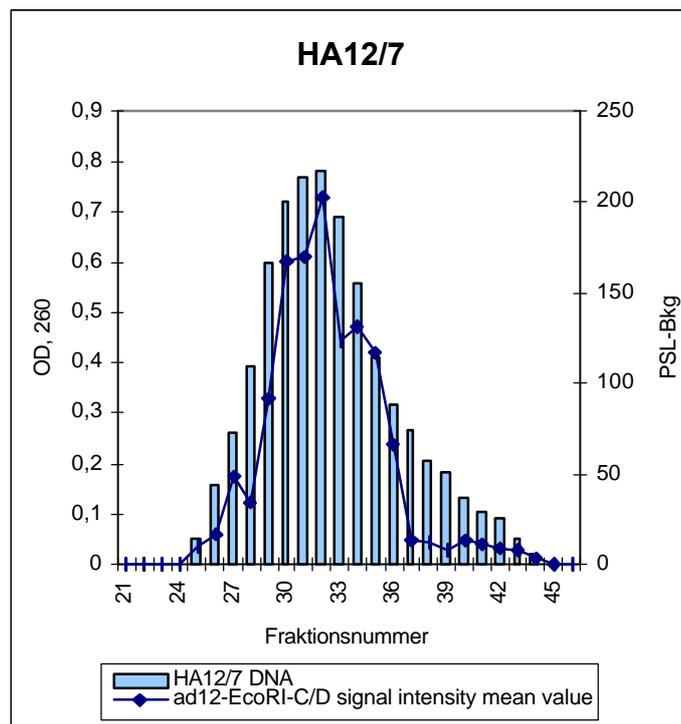


Abbildung 22: Schwebendichtegradientenzentrifugation der genomischen DNA der Zelllinie HA12/7. Gleiche Anteile jeder Fraktion wurden mit einer Dot-Blot-Apparatur auf eine Nylonmembran aufgebracht und anschließend mit klonierten Fragmenten (EcoRI-C und EcoRI-D) des Ad12 Genoms hybridisiert. Die gezeigte Kurve der Signalintensität entspricht dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Dot-Blotexperimenten.

In dem Tumor T1111(2) wurde eine Integration adenoviraler DNA nahe des *long terminal repeats* (LTR) einer intrazisternalen A-Partikel (IAP) Sequenz, eines endogenen Retrovirus gefunden. Diese Verknüpfungsstelle war von besonderem Interesse, da sie offenbar in späteren Zellpassagen verloren ging (Lichtenberg et al., 1987).

Der GC%-Gehalt des Ad12 Genoms stimmt exakt mit dem der Hamster-IAP-Sequenz (Ono et al., 1985) überein (7951 Bp; 46,5% GC). Darüber hinaus postulierten einige Arbeiten (Rynditch et al., 1998) eine isopyknische Lokalisierung endogener retroviraler Sequenzen im Genom ihrer Wirtszellen. Daher wurde hier

auch die Verteilung von IAP-Sequenzen im BHK 21 Genom untersucht (Abbildung 23a). Die Intensitätskurve des IAP-spezifischen Signals folgt nahezu perfekt dem Profil der genomischen DNA, nur eine Schulter der Intensitätskurve deutet möglicherweise eine leichte Erhöhung der IAP-Konzentration in isopyknischen Fraktionen an. Die IAP-Sequenzen schienen in BHK21 Zellen also nicht auf die isopyknischen Abschnitte des Genoms beschränkt zu sein. Der Tumor T1111(2) bzw. die Tumorzelllinie H1111(2) wurde nicht selbst untersucht. Die bekannte Präinsertionssequenz (Lichtenberg et al., 1987) (1311 Bp, 48,3% GC) zusammen mit der Integration nahe einer IAP-Sequenz könnten auf eine isopyknische Integration hindeuten. Aufgrund der nicht-isopyknischen Lokalisierung der IAP-Sequenzen ist dies jedoch nicht sicher.

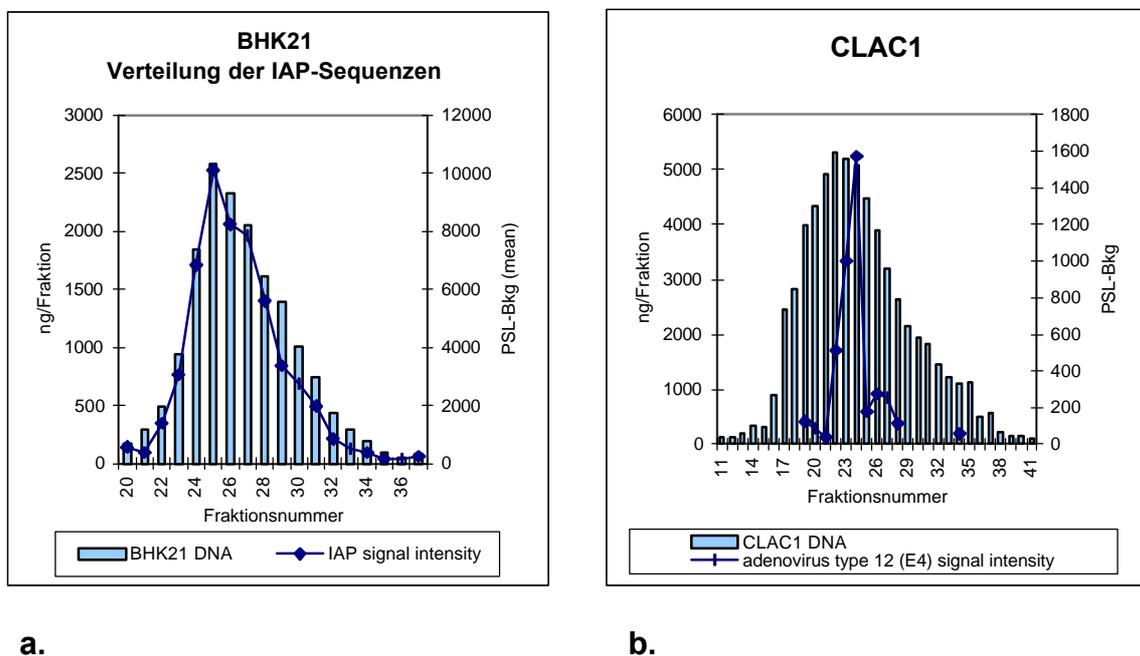


Abbildung 23: Präparative Schwebelichtgradientenzentrifugation genomischer DNA der Zelllinien BHK 21 (a) und der Ad12-transformierten Tumorzelllinie CLAC1 (b). Für Abbildung (a) wurden gleiche Anteile jeder Fraktion auf eine Nylonmembran aufgebracht und mit dem 840 Bp EcoRV-HindIII-Fragment des IAP Gens des syrischen Hamsters hybridisiert. Aufgetragen ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Dot-Blotexperimenten. In (b) wurden adenovirus-spezifische Sequenzen mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Dabei wurden Primer, die an die E4-Region von Ad12 binden verwendet (E4-1/E4-2).

In frühen Passagen der Hamstertumorzelllinie CLAC1 (Stabel and Doerfler, 1980) wurden bis zu 12 Kopien Ad12 DNA in integrierter Form gefunden. Es wurde jedoch wiederholt beobachtet, daß nach mehrmaligem Auftauen von unabhängig eingefrorenen Zellen im Southern Blot Experiment keine Ad12 DNA mehr detektierbar war. Doch PCR Analysen zeigten, daß wenigstens kurze Ad12 Sequenzen integriert geblieben sind (Dissertation G. Orend, 1994; Pfeffer et al., 1999). In der Passage (p14), die hier untersucht wurde, konnte die Ad12 DNA nicht

durch die Southern Blot-Technik nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt); eine frühere Passage stand nicht zur Verfügung. Es wurden daher Primerpaare aus der E4 Region des Ad12 Genoms verwendet, um virale Sequenzen in den Fraktionen des CLAC1 DNA - Gradienten zu amplifizieren. Obwohl die Zahl der Amplifikationszyklen hoch war, konnten Amplifikationsprodukte nur in einer begrenzten Anzahl von Fraktionen des CLAC1 Gradienten nachgewiesen werden (Abbildung 23 b). Das stärkste Signal lag dabei nahe der Ad12 DNA typischen Position. Nahezu die gleiche Verteilung der Signalintensität wurde auch gefunden, als ein Primerpaar aus der E1-Region des Ad12 Genoms verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Zelllinie HE5 (Gahlmann and Doerfler, 1983) ist eine Ad2-transformierte Hamsterzelllinie und trägt etwa 2-3 Kopien integrierter Ad2 DNA. Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob die virale DNA nur an einem Ort im Genom integriert vorliegt. Ad2-transformierte Hamsterzellen sind schwer zu etablieren, da Ad2 Hamsterzellen produktiv infiziert. Die Zelllinie HE5 ist daher mit UV-inaktivierten Ad2-Virionen etabliert worden (Cook and Lewis, 1979). Mit einem Primerpaar vom linken Ende des Ad2 Genoms konnten keine Signale in der Ad2-isopyknischen Position gefunden werden, wohl aber in Fraktionen, die einen deutlich geringerem GC%-Gehalt entsprachen (Abbildung 24).

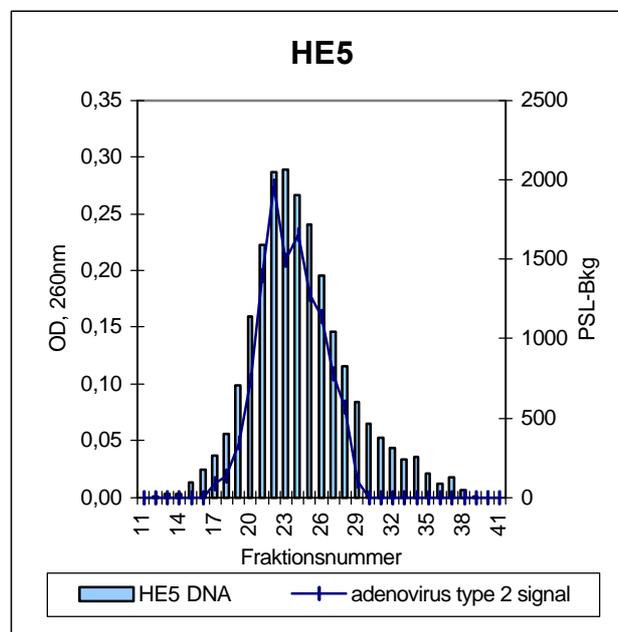


Abbildung 24: Ergebnis der Schwebeschichtgradientenzentrifugation der genomischen DNA der Ad2-transformierten Zelllinie HE 5. Adenovirus Typ 2 spezifische Sequenzen wurden in einer PCR mit Hilfe Ad2 spezifischer Primer nachgewiesen (ad2-1/ad2-2). Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus zwei unabhängigen PCR-Reaktionen.

Offensichtlich ist der Integrationsort der Ad2 DNA in HE5 nicht isopyknisch. Diese Beobachtung stimmt auch mit den bisherigen Angaben über die Präinsertionssequenz (840 Bp; 33,6 %GC) überein (Gahlmann and Doerfler, 1983).

2.5 Adenovirus DNA Integration während der produktiven Infektion

Die Integration viraler DNA in das Wirtsgenom einer produktiv infizierten Zelle ist schwer nachzuweisen, dennoch gibt es Hinweise, daß virale DNA kovalent mit zellulärer DNA verknüpft wird, wenn (humane) KB Zellen produktiv mit Ad2 infiziert werden (u.a. Schick et al., 1976; Doerfler et al., 1980; Deuring et al., 1981).

Humane DNA ist im Vergleich zu Hamster-DNA weitaus heterogener, das Profil des humanen Genoms ist asymmetrischer (Abbildung 25). Abbildung 26 zeigt das analytische Profil von DNA aus KB Zellen, die 20-22h nach der Infektion mit Ad2 extrahiert worden war. Das Profil der humanen DNA ist noch sichtbar, aber es wird von dem starken Ad2 DNA Profil dominiert. Die gleiche DNA Probe wurde auch durch eine präparative Schwebelichtgradientenzentrifugation fraktioniert (Abbildung 27a). Sehr starke Ad2- spezifische Signale konnten nur in den Ad2 DNA-korrespondierenden Fraktionen nachgewiesen werden. In den Fraktionen die den Hauptteil des humanen Profils ausmachen, entspricht der Verlauf des Ad2 DNA-Signals dem Verlauf des Profils der genomischen DNA (Abb.27b). Es gibt daher keine Anzeichen für eine massive, nicht isopyknische Integration von Ad2 DNA. Eine isopyknische Integration viraler DNA während der produktiven Infektion ist jedoch nicht auszuschließen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit DNA erhalten, die 2 h p.i. aus KB Zellen gewonnen wurde (Daten nicht gezeigt).

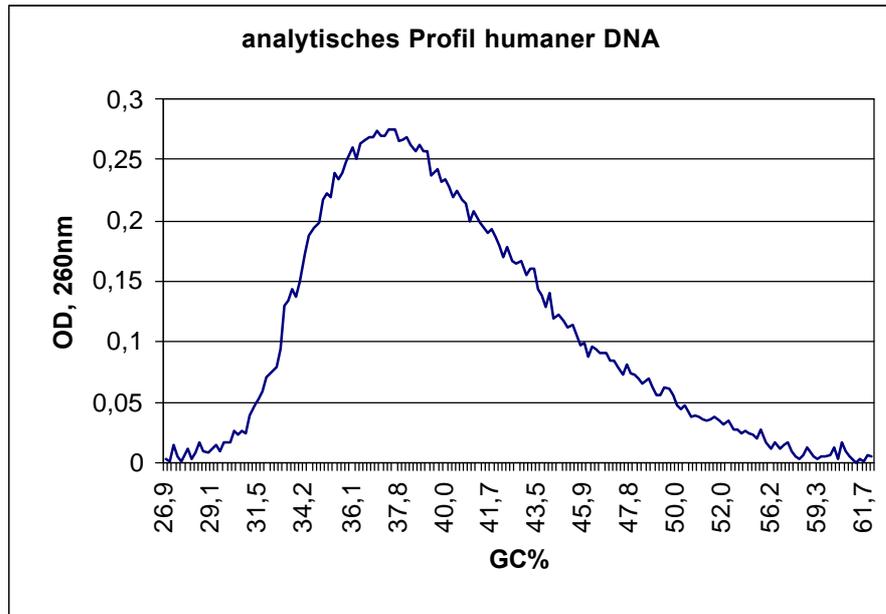


Abbildung 25: Profil humaner DNA nach einer Schwebedichtegradientenzentrifugation in der analytischen Ultrazentrifuge. Die Formeln für die Berechnung der Schwebedichte an jedem Punkt der Abszisse und für die Berechnung der entsprechenden GC%-Werte sind in der Beschriftung zu Abbildung 17 gegeben.

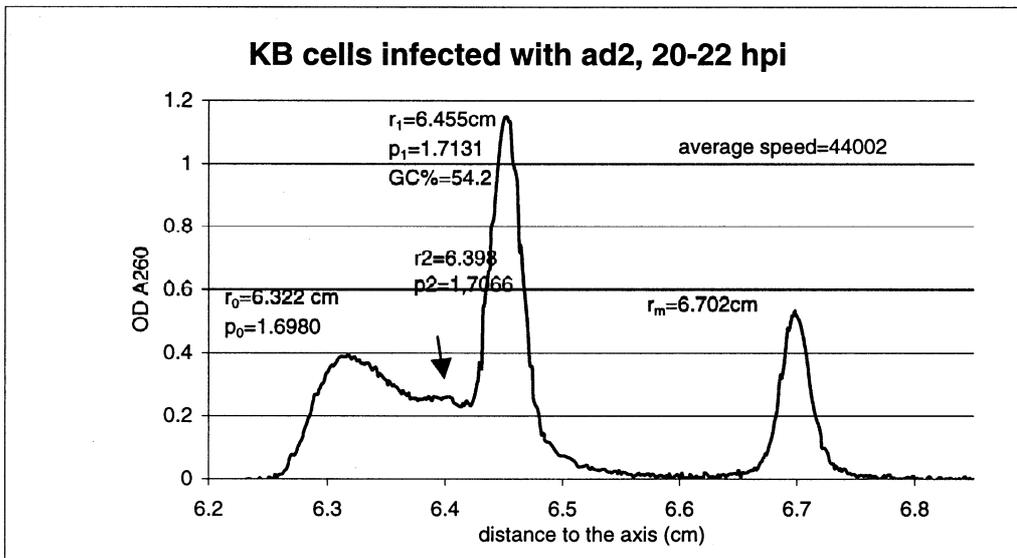
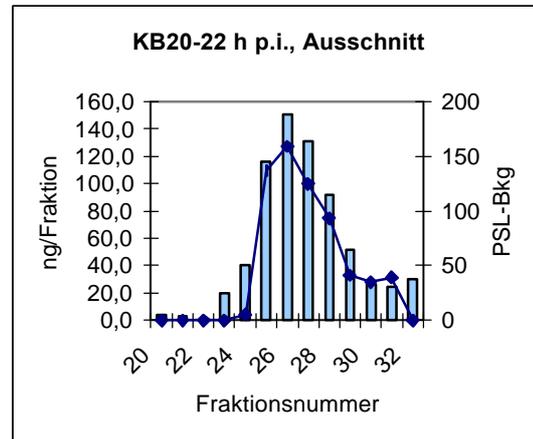
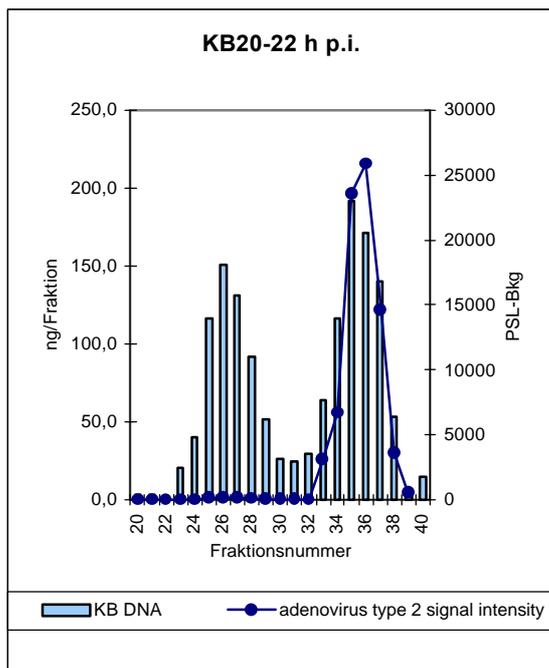


Abbildung 26: Das analytische Profil der DNA aus KB Zellen 20-22h p.i. mit Adenovirus Typ 2. Aufgetragen ist die Absorption bei 260 nm innerhalb der Probenzellen der analytischen Ultrazentrifuge. Der rechte, äußere Peak entspricht der Marker-DNA des Bakteriophagen 2c. Der dominante Peak der adenoviralen DNA ist deutlich zu sehen.



a.

b.

Abbildung 27: Schwebedichtegradientenzentrifugation der DNA aus KB Zellen 20-22 h p.i. mit Adenovirus Typ 2. Aliquots jeder Fraktion wurden mittels Dot-Blot auf eine positiv geladene Nylonmembran gebracht. Die DNA wurde anschließend mit radioaktiv markierter Ad2 DNA hybridisiert (a). Abb. 27b. zeigt einen Ausschnitt aus Abb. 27a.

Zusammenfassung III: Isochoren und Integration adenoviraler DNA

- Das analytische Profil des Genoms der BHK 21 – Zelllinie (*Mesocricetus auratus*) ist leicht negativ asymmetrisch; Satelliten im Profil sind nicht zu erkennen
- Im Vergleich zu Maus (*Mus musculus*) oder Ratte (*Rattus norvegicus*) scheint das Genom der BHK 21 – Zelllinie heterogener, es ist jedoch weitaus weniger heterogen als das menschliche Genom
- In der Zelllinie T637 ist die adenovirale DNA in eine Region mit deutlich geringerem GC%-Gehalt integriert; dies zeigt sich besonders deutlich bei der Untersuchung der revertanten Zelllinien TR2 und TR12
- Auch in der Ad12-transformierten Zelllinie HA12/7 und der Ad2-transformierten Zelllinie HE 5 legen die Ergebnisse der präparativen Schwebelichtegradientenzentrifugation eine Integration der adenoviralen DNA in GC%-ärmere Regionen des Genoms nahe
- In der untersuchten Passage der Tumorzelllinie CLAC1 konnte mit Southern Blot Hybridisierungen keine adenovirale DNA nachgewiesen werden; mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion und adenoviruspezifischen Primern konnte in einigen wenigen Fraktionen Adenovirus DNA nachgewiesen werden. Diese Fraktionen lagen im Profil nahe der adenoviruspezifischen Position.
- Vorläufige Ergebnisse legen nahe, daß während der produktiven Infektion von KB – Zellen mit Adenovirus Typ 2 keine massive nicht-isopyknische Integration viraler Genome stattfindet.

3. Diskussion

3.1 Merkmale der *in vitro* Rekombinationsreaktion

Die Reaktion, die im zellfreien System zur Verknüpfung des PstI-D-Fragmentes mit dem p7pBR322-Plasmid und letztendlich zur Integration des Fragmentes in das Plasmid führt, ist beschrieben worden. Die Reaktion findet zwischen kurzen Sequenzhomologien statt, die auf unterschiedlichen, jeweils linearisierten DNA-Molekülen liegen. Die interagierenden Homologien sind dabei gleich orientiert, sie ähneln daher kurzen direkten Sequenzwiederholungen, die durch einen Doppelstrangbruch voneinander getrennt sind. Zwei Parameter bestimmen im wesentlichen die Auswahl der interagierenden kurzen Sequenzhomologien, bzw. die Auswahl des Rekombinationsortes: erstens die Länge und Ausprägung der kurzen Sequenzhomologie und zweitens der Abstand der kurzen Sequenzhomologien vom jeweiligen DNA-Ende, also die Zahl der im rekombinanten Molekül deletierten Nukleotide.

Sind die Nukleotide eines 5'-Überhanges Teil einer der interagierenden Sequenzhomologien, so bleiben diese im rekombinanten Molekül erhalten. Umgekehrt bleibt die genetische Information der 3'-Überhänge der PstI-Fragmente in den rekombinanten Molekülen sehr wahrscheinlich nicht erhalten. Diese Beobachtung ist vereinbar mit der Überlegung, daß keine 5'-3'-Exonuklease an der Reaktion beteiligt ist, möglicherweise aber eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die Einzelstränge erzeugt und so die interagierenden Homologien exponiert.

In den gereinigten Extrakten konnte ferner kein Ku70-Protein nachgewiesen werden, eine wesentliche Komponente des vorwiegend gewählten Doppelstrangbruchreparaturweges in Säugern. Die Experimente mit HeLa-Zellkernextrakten zeigen, daß die beschriebene Aktivität nicht nur in Hamster-, sondern auch in menschlichen Zellen vorhanden ist.

3.2 Vergleich des zellfreien Systems mit *in vitro* Rekombinationssystemen zur Doppelstrangbruchreparatur

Verknüpfungsreaktionen, die auf kurze Sequenzhomologien in den beteiligten Partnermolekülen angewiesen sind und zum definierten Verlust von Nukleotiden führen, sind auch in anderen Systemen beschrieben worden. Ähnliche Reaktionen sind u.a. in *E. coli* (Conley et al., 1986; 1986), in Säugerzellen (Roth and Wilson, 1986) und in humanen Kernextrakten (Thacker et al., 1992; Nicolás and Young, 1994; Nicolás et al., 1995) beschrieben worden.

Die dort beschriebenen kurzen Sequenzhomologien oder Mikrohomologien waren 1-10 Bp lang, doch im Unterschied zu der in dieser Arbeit beschriebenen Verknüpfungsreaktion lagen beide der interagierenden kurzen Sequenzhomologien meist entweder auf einem der Einzelstrangüberhänge (Roth and Wilson, 1986) oder unmittelbar an den DNA-Enden (Nicolás and Young, 1994; Nicolás et al., 1995). Daher war dort das Ausmaß der Deletionen geringer als in dem hier beschriebenen zellfreien System. Deletionen von mehreren Kilobasenpaaren wurden nie beobachtet. Die Fähigkeit auch kurze Sequenzhomologien zu nutzen, die weit von dem DNA-Ende entfernt sind, erhöht natürlich die Verknüpfungswahrscheinlichkeit.

Die Unterschiede in der Länge und der Position der genutzten kurzen Sequenzhomologien liegen vermutlich in unterschiedlichen Substrat- und Assaybedingungen der verschiedenen Systeme.

Die Reaktion des zellfreien Systems ähnelt dem *single-strand annealing* (SSA) Modell; unterscheidet sich aber von ihm in zwei gravierenden Eigenschaften. Die Homologien, die dem SSA-Modell zugrunde gelegt werden, sind wesentlich ausgedehnter (~400 Bp) als die kurzen Sequenzhomologien des zellfreien Systems und das SSA-Modell setzt die Aktivität einer 5'-3'-Exonukleaseaktivität voraus, um Einzelstränge zu erzeugen (van Dyck et al., 1999, 2001).

Die Reaktion des zellfreien Systems ähnelt mehr dem „nicht-akkuraten“ Doppelstrangbruchreparaturmechanismus aus Säugerzellen, der ebenfalls zu einer Verknüpfung zweier DNA-Fragmente durch die Interaktion kurzer Sequenzhomologien (1-10 Bp) und zu Deletionen der dazwischenliegenden Nukleotide führt (Thacker et al., 1992; Nicolás and Young, 1994; Nicolás et al., 1995). Ebenso ist er unabhängig von Ku, findet anscheinend sogar nur statt, wenn Ku nicht aktiv ist (Boulton and Jackson, 1996; Critchlow and Jackson, 1998).

Versuche, die Proteine, die an diesem „nicht-akkuraten“ Doppelstrangbruchreparaturmechanismus beteiligt sind, aufzureinigen, führten bislang nicht zu befriedigenden Ergebnissen. Die teilweise Aufreinigung der beteiligten Aktivität führte zur Isolierung einer *single strand ligase* oder *non homologous recombination ligase activity* (NHR ligase), die unabhängig von bislang bekannten DNA Ligasen war, und zur Isolierung einer *homologous pairing activity* (HPP-1) (Fishel et al., 1991). Eine weitergehende Charakterisierung dieser Aktivitäten oder die Identifizierung weiterer Komponenten erfolgte jedoch nicht.

Eine mögliche Komponente dieses Reparaturweges ist Mre11, da dieses Protein *in vitro* ähnliche Verknüpfungen schließen kann (Paull and Gellert, 2000).

3.3 Bewertung des Rekombinationssystems

Eine Hypothese, die dem *in vitro* Rekombinationssystem zugrunde lag, war, daß eine gefundene Präinsertionssequenz aufgrund spezifischer Merkmale auch in einem zellfreien System als Zielsequenz adenoviraler DNA erkannt werden würde (Jessberger et al., 1989). Doch die Reaktion im zellfreien System fand bei Einsatz fraktionierter Kernextrakte ausschließlich zwischen kurzen Sequenzhomologien statt. Die kurzen Sequenzhomologien waren das bestimmende Merkmale der *in vitro* Rekombination. Ähnliche kurze Sequenzhomologien wurden auch an den Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler und zellulärer DNA in Ad12-transformierten Zellen und Ad12-induzierten Tumorzellen gefunden (vgl. Abschnitt 3.5).

Aufgrund der Länge der Substrate (p7pBR322: 6312 Bp; PstI-D: 3175 Bp) und der so angebotenen Sequenzvariabilität war das System sehr gut dazu geeignet, die notwendige Länge und die notwendige Position und Anordnung der kurzen Sequenzhomologien zu untersuchen. Ununterbrochene Homologien sind im Vergleich zu unterbrochenen Homologien offenbar bevorzugt, auch wenn diese Verknüpfungen zu einem größeren Verlust an Nukleotiden führt. Bei Homologien vergleichbarer Qualität aber scheint die bevorzugt zu sein, die zum geringsten Verlust an Nukleotiden führt.

Die genaue Analyse der Verknüpfungsstellen läßt jedoch den Schluß zu, daß die mit den Substraten p7pBR322 und PstI-D gegebenen Möglichkeiten nicht optimal sind. Dies drückt sich auch in einer geringen Rekombinationsfrequenz aus. Für eine effizientere Fraktionierung der an dieser Rekombinationsreaktion beteiligten Proteine ist ein veränderter Assay notwendig.

3.4 Vorschläge für die Entwicklung eines Rekombinationssystems zur Charakterisierung der beteiligten Proteinkomponenten

Die beiden Rekombinationspartner, pBR322p7 und PstI-D, wurden gewöhnlich für 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Jessberger et al., 1989; Tatzelt et al., 1992, 1993). Alle in dieser Arbeit dokumentierten Rekombinanten sind unter diesen Bedingungen gewonnen worden. Die Art der gefundenen kurzen Sequenzhomologien legt jedoch nahe, daß eine Interaktion der beteiligten kurzen Sequenzhomologien bei niedrigeren Inkubationstemperaturen (und ausgedehnteren Reaktionszeiten) leichter erfolgen kann. Reaktionstemperatur und Inkubationszeit beeinflussen sicherlich die Wahl der interagierenden Sequenzhomologien. So sind bei einer Inkubation bei 37°C für 30 Minuten relativ stark ausgeprägte kurze Sequenzhomologien möglicherweise

bevorzugt, während bei geringeren Temperaturen auch kurze Sequenzhomologien mit schwächer ausgeprägten (also kürzeren) Homologien gewählt werden könnten. Dies würde dann sicherlich auch zu einem Anstieg der Rekombinationsfrequenz führen. Die höhere Temperatur bei 37°C hat aber den Vorteil, den natürlichen Bedingungen eher zu entsprechen.

Der Rekombinationsassay in seiner bisherigen Form hat mehrere Nachteile; so erfolgte der routinemäßige Nachweis mit Hilfe des *E. coli* Transfektionsassays, der die Gefahr barg, daß Teile der Reaktion auch in *E. coli* katalysiert werden. Der Nachweis war zudem langwierig und die Rekombinationsfrequenz trotz fortschreitender Fraktionierung gering (Tatzelt, 1992; Tatzelt et al., 1993). Wünschenswert für die Charakterisierung der beteiligten Proteinaktivitäten wäre jedoch ein schnellerer und sicherer Nachweis der Rekombinanten, unabhängig von *E. coli*.

Die Rekombinationsfrequenz würde sicher steigen, wenn nur eine Verknüpfung für den Nachweis der Rekombinationsaktivität gebildet werden müßte. Für die Amplifikation und den Nachweis der Rekombinationsprodukte im *E. coli* Assay müssen aber zwei Verknüpfungen gebildet worden sein. Die Möglichkeiten zur Bildung einer rechtsterminalen Verbindung sind zudem stark limitiert.

Die Untersuchungen an den bisher isolierten *in vitro* Rekombinanten belegen, daß Verknüpfungen zwischen ununterbrochenen kurzen Sequenzhomologien begünstigt sind. Doch sind zwischen dem PstI-D Fragment und p7pBR322 nur Verknüpfungen zwischen ununterbrochenen kurzen Sequenzhomologien von bis zu 9 Bp möglich. Längere ununterbrochene kurze Sequenzhomologien stehen in diesem System nicht zu Verfügung. Gleichzeitig deuten die ausgedehnteren, aber unterbrochenen kurzen Sequenzhomologien an, daß die beteiligten Proteinkomponenten größere Nukleotidsequenzen umfassen können. Führen längere ununterbrochene Sequenzhomologien zu einer Erhöhung der Rekombinationsfrequenz? Die bisherigen Ergebnisse zeigen darüber hinaus, daß diejenigen Kombinationen von kurzen Sequenzhomologien bevorzugt gewählt werden, die in den entsprechenden *in vitro* Rekombinanten zum geringsten Nukleotidverlust führen. Offenbar wirkt sich ein geringerer Abstand zum jeweiligen DNA Ende ebenfalls positiv auf die Rekombinationsfrequenz aus. Es wäre also sehr interessant, DNA Fragmente zum Nachweis der Rekombinationsaktivität einzusetzen, die nahe ihrer Enden kurze ununterbrochene Sequenzhomologien mit einer Länge von 10 – 15 Bp tragen. Sehr wahrscheinlich wäre die Rekombinationsfrequenz höher und unter Umständen ließe sich das Rekombinationsprodukt direkt durch elektrophoretische Auftrennung und/oder Southern Blot Hybridisierung nachweisen. Durch die Wahl einer geeigneten Restriktionsschnittstelle könnten die Rekombinanten leicht und schnell charakterisiert werden.

Die Rekombinationsaktivität wird sehr wahrscheinlich von einer Exonukleaseaktivität begleitet, die die interagierenden kurzen Sequenzhomologien auf den entstehenden DNA Einzelsträngen offenlegt. Nähere Charakterisierungen dieser Aktivität wären wünschenswert. Die untersuchten Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten deuten darauf hin, daß keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität beteiligt ist, eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität scheint hingegen sehr wohl möglich. Durch geeignete radioaktive Markierung der terminalen Nukleotide ließe sich dies feststellen. Wird die beteiligte Exonukleaseaktivität durch nicht-homologe DNA-Enden stimuliert und durch homologe Nukleotidsequenzen am DNA-Ende des Partnermoleküls inhibiert (Paull and Gellert, 2000) ? Eine Beteiligung einer spezifischen Exonukleaseaktivität an der Rekombinationsreaktion könnte auch als sensitiver Nachweis der Rekombinationsaktivität genutzt werden.

3.5 Sind die Beobachtungen aus dem zellfreien System übertragbar auf einen Integrationsmechanismus der adenoviralen DNA in die zelluläre DNA des Wirtsgenoms?

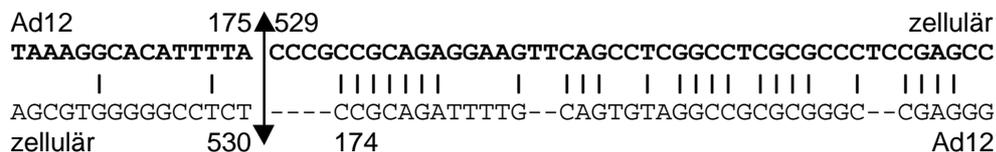
Das Geschehen in der Zelle ist sicher weitaus komplexer als die Vorgänge, die zur Bildung einer Verknüpfungsstelle im *in vitro* System führen. Die Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler und zellulärer DNA in der Zelle sind weiteren Rekombinationsvorgängen unterworfen, die transformierte Zelle der Selektion.

Die aus Ad12-induzierten Tumorzellen und Ad12-transformierten (Hamster-)zellen isolierten Verknüpfungsstellen zwischen viraler und zellulärer DNA sind daher möglicherweise das Produkt verschiedenster, aufeinanderfolgender Rekombinationsprozesse. Dennoch sollen hier kurz die Verknüpfungsstellen aus den *in vitro* Rekombinanten mit denen der aus Ad12-induzierten Tumorzellen und Ad12-transformierten Zellen isolierten Verknüpfungsstellen verglichen werden. Dazu sind in Anhang A die Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler und zellulärer DNA aus den Ad12-induzierten Hamstertumorzelllinien CLAC1, CLAC3, T191 und T1111(2), der Ad2-transformierten Hamsterzelllinie HE5, der Ad12-transformierten Hamsterzelllinie T637 und des Ad12-induzierten Maustumors CBA12-1-T aufgeführt. Dargestellt ist jeweils die rekombinante DNA und (darunter) die jeweils verdrängte DNA. Im Fall der Verknüpfungsstellen T191 und CLAC3 war dies nur zum Teil möglich, da hier die Präinsertionssequenzen nicht kloniert worden waren.

Die wichtigsten Merkmale der *in vitro* Rekombinationsreaktion war die Beteiligung eines freien DNA-Endes an der Reaktion, das Auftreten von kurzen Sequenzhomologien unmittelbar an der Verknüpfungsstelle und die Deletion der Nukleotide zwischen DNA-Ende und kurzer Sequenzhomologie. Auch bei den *in vivo*

Verknüpfungsstellen waren meist die Enden des Ad12 Genoms an der Verknüpfung beteiligt, immer wurden virale Nukleotide deletiert, in vielen Fällen auch Nukleotide der zellulären Zielsequenz. Nur in HE5 erfolgte die Integration ohne Verlust zellulärer Nukleotide (Gahlmann and Doerfler, 1983). Um festzustellen, ob kurze Sequenzhomologien zwischen rekombinanter und verdrängter DNA auftraten, mußte die Präinsertionssequenz bekannt sein. So war im Fall von CLAC3 und T191 keine Aussage über das Auftreten von *short sequence homologies* an der Verknüpfungsstelle möglich. In den übrigen Fällen ergibt sich kein einheitliches Bild. Die sequenzierten Verknüpfungsstellen aus CBA12-1-T, aus HE5 und zwei Verknüpfungsstellen in T1111(2) zeigten keine *short sequence homologies*, die vergleichbar wären mit denen der *in vitro* Rekombinanten. Demgegenüber wiesen die Verknüpfungsstellen in CLAC1, T637 (os2) und eine Verknüpfungsstelle aus T1111(2) kurze Sequenzhomologien auf, die durchaus mit denen der *in vitro* Rekombinanten verglichen werden konnten. Besonders die Verknüpfungsstelle aus T637 schien ununterscheidbar von denen aus *in vitro* Rekombinanten (Abbildung 28). Die Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten gleichen also nicht allen Verknüpfungsstellen, die aus Ad12-induzierten Tumoren oder Ad12- bzw. Ad2-transformierten Zelllinien kloniert worden waren. Aber sie glichen einem Teil dieser Verknüpfungsstellen sehr genau.

CLAC1 (Stabel and Doerfler, 1982)



T637os2 (Knoblauch et al., 1996)

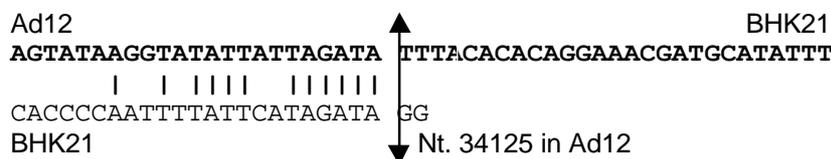


Abbildung 28: Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler und zellulärer DNA aus dem Ad12-induzierten Tumor CLAC1 und der Ad12-transformierten Zelllinie T637. Zur Erläuterung siehe auch Bildunterschrift zu Abbildung 4.

Es ist durchaus denkbar, daß verschiedene Prozesse zur Integration adenoviraler DNA führen können, das *in vitro* System spiegelt davon nur eine wieder. Es ist auch möglich, daß ein bevorzugt gewählter Integrationsmechanismus durch darauffolgende Rekombinationsprozesse wie etwa Amplifikationen verschleiert wird.

Das Auftreten von kurzen Sequenzhomologien und der Verlust von Nukleotiden ist auch an den Verknüpfungsstellen zwischen zellulärer und SV40 DNA (Stringer 1981, 1982), zwischen zellulärer und HPV16 DNA (Wagatsuma et al., 1990) und an den Verknüpfungsstellen zwischen zellulärer und mikroinjizierter transgener DNA (Chen et al., 1995; McFarlane and Wilson, 1996) beobachtet worden.

Die im zellfreien System beschriebene Aktivität ist sowohl in Kernextrakten uninfizierter und Ad12-infizierter Hamsterzellen als auch in humanen Kernextrakten beobachtet worden. Die Rekombinationsreaktion wird von wirtszelleigenen Faktoren katalysiert; möglicherweise aber wird sie durch viruseigene oder virusinduzierte Faktoren noch zusätzlich stimuliert (Fechteler, 1996). Die Beobachtung, daß die beschriebene Aktivität sowohl in Hamsterzellen wie auch in humanen Zellen beobachtet wird, bedeutet, daß sie der Adenovirus Typ 12 DNA sowohl während der abortiven Infektion von Hamsterzellen als auch während der produktiven Infektion von menschlichen Zellen zur Verfügung steht.

Überträgt man die Ergebnisse aus dem zellfreien System auf die Vorgänge in der Zelle, so müßten auch dort neben den freien Enden der viralen DNA freie Enden der zellulären DNA vorliegen, damit es zu einer Verknüpfung kommt. Es ist denkbar, daß diese freie Enden der zellulären DNA durch einen spontanen Doppelstrangbruch (DSB) entstehen. Eine wichtige (natürliche) Quelle von Doppelstrangbrüchen ist die DNA Replikation, die in jeder sich teilenden Zelle stattfindet. Auch wenn dieser Prozess selbst sehr akkurat ist, so erleidet jede Zelle doch etwa 10 DSB pro Zellzyklus (Übersicht Haber, 1999). Diese hohe Frequenz mag daran liegen, daß jeder Einzelstrangbruch im Elternstrang, z.B. an einer Topo I – Schnittstelle in einen Doppelstrangbruch umgewandelt werden kann, nachdem die Replikationsgabel an dieser Läsion zum Stillstand kommt (Roth and Wilson, 1988). Auch Defekte in der Reifung von Okazaki-Fragmenten können zur Häufung von DSB führen (Lieber, 1997; Tishkoff et al., 1997). Beobachtungen an intrazellulären Formen adenoviraler DNA deuten darauf hin, daß es tatsächlich einen Zusammenhang zwischen Integration viraler DNA und der Replikation zellulärer DNA gibt (Schick et al., 1976; Fanning and Doerfler, 1977). Darüber hinaus führt die Infektion mit Adenovirus zusätzlich zu Chromatidbrüchen und –austauschen in den infizierten Zellen (Stich and Yohn, 1967; McDougall, 1971; McDougall et al., 1972).

In einigen Arbeiten ist auch ionisierende Strahlung eingesetzt worden, um eine effizientere Integration adenoviraler Vektoren in das Wirtsgenom zu erreichen (Zeng et al., 1997). Ionisierende Strahlung verursacht Doppelstrangbrüche; tatsächlich war hier die Integrationseffizienz deutlich höher als in vergleichbaren, nicht-bestrahlten Zellen.

Im Unterschied zum zellfreien System sind die 5'-Enden des Adenovirusgenoms aber kovalent mit dem terminalen Protein (TP) verknüpft. Das terminale Protein schützt die

DNA u.a. vor 5'-3'-Exonukleasen und verhindert die Bindung des Ku-Heterodimers an die DNA-Enden (de Vries et al., 1989) und verhindert so den Eintritt der viralen DNA in einen der vorrangig gewählten Doppelstrangbruchreparaturwege in Säugerzellen. Im Gegensatz zu den durch die kovalent an das terminale Protein gebundenen 5'-Enden des viralen Genoms sind die 3'-Enden wahrscheinlich weniger gegen Exonukleasen geschützt. Auch dies steht im Einklang mit dem *in vitro* Rekombinationssystem, an dem anscheinend keine 5'-3'-Exonuklease beteiligt ist, vermutlich aber eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität.

Eine aktive Rolle des terminalen Proteins am Integrationsprozess ist nicht bekannt, doch besitzt das TP bemerkenswerte Eigenschaften, die eine Integration ins Wirtsgenom erleichtern könnten. Virale DNA, die noch kovalent mit dem TP verbunden ist, wird effizienter in den Nukleus transportiert als nackte virale DNA (Schröer et al., 1997). Das TP ist verantwortlich für eine feste Assoziation des viralen Genoms mit der Kernmatrix und für eine effiziente Transkription der frühen Gene (Schaack and Shenk, 1989; Schaack et al., 1990). Offensichtlich führt das terminale Protein das virale Genom vorzugsweise in bestimmte Territorien des Zellkerns. Die Faktoren, die für eine Assoziation des TP mit der Kernmatrix verantwortlich sind, sind teilweise bekannt (siehe 3.7).

Virale Genome, die noch kovalent mit dem terminalen Protein verbunden sind, können relaxierte zirkuläre Moleküle bilden, in denen die Enden des viralen Genoms zusammengeführt sind (Robinson et al., 1973). Diese Konformation könnte Integration an einem Punkt des Wirtsgenoms erleichtern (Doerfler et al., 1983). An allen sequenzierten Verknüpfungsstellen aus Ad12- oder Ad2-transformierten Zelllinien sind terminale virale Nukleotide deletiert. An einer Verknüpfungsstelle in T637 sind es nur zwei, in einer Verknüpfungsstelle in CLAC1 sogar 174 Basenpaare. In anderen beschriebenen Verknüpfungsstellen sind es 8/10, 9, 45, 62, und 64 Basenpaare. Möglicherweise sind die äußersten Nukleotide aufgrund der Verknüpfung mit dem TP nicht zugänglich und gehen bei einer Rekombinationsreaktion verloren.

3.6 Die Rolle der Präinsertionssequenz p7

Eine dem *in vitro* Rekombinationssystem zugrundeliegende Idee ist gewesen, daß eine Zielsequenz, die einmal als Integrationsort gedient hatte, auch von einem zellfreien System erkannt wird (Jessberger et al., 1989). Tatsächlich wurden mit dem zellfreien System viele Rekombinanten isoliert, die eine Verknüpfungsstelle zwischen der p7-Präinsertionssequenz und viralen Fragmenten trugen. Auch wurden keine Rekombinanten mit vier zufällig ausgesuchten Hamstersequenzen oder dem

pBR322-Vektor gefunden (Jessberger et al., 1989). Nichtsdestotrotz gibt es auch Verknüpfungsstellen zwischen dem PstI-D Fragment und pBR322 Sequenzen des p7pBR322 Vektors; alle rechtsterminalen Verknüpfungsstellen - die die gleichen Eigenschaften wie die linksterminalen Verknüpfungsstellen besitzen - liegen nicht innerhalb der p7-Präinsertionssequenz. Das charakteristische Merkmal der meisten *in vitro* Rekombinanten sind die kurzen Sequenzhomologien unmittelbar an der Verknüpfungsstelle. Und hier liegt tatsächlich ein Vorteil der p7-Präinsertionssequenz gegenüber zufällig ausgesuchten Hamstersequenzen oder dem pBR322 Vektor: aufgrund ihrer GC- und CpG- reichen Sequenz gibt es viele kurze Sequenzhomologien zu den linksterminalen Nukleotiden (5'-TGCAGCGTGCGGCC...-3') des PstI-D Fragments. Dies hat offenbar die Kombination p7pBR322 – PstI-D vor allen anderen getesteten begünstigt.

Nun ist dies eine Eigenschaft der p7-Präinsertionssequenz, die die Rekombination mit dem (internen) adenoviralen PstI-D Fragment im *in vitro* Rekombinationssystem begünstigt, nicht aber allein für die Integration des Ad12 Genoms verantwortlich sein kann. Es gibt andere Sequenzen innerhalb der p7-Präinsertionssequenz, die mitverantwortlich für die ursprüngliche Integration der Ad12 DNA gewesen sein könnten. So gibt es gehäuft um die ursprüngliche CLAC1 Integrationsstelle indirekte Sequenzwiederholungen, die Haarnadelstrukturen ausbilden könnten (Abbildung 12). Dyadische Symmetrien sind in mehreren Präinsertionssequenzen und zwischen viraler und zellulärer DNA an Verknüpfungsstellen gefunden worden (Übersicht Doerfler et al., 1983; Knoblauch et al., 1996). Ähnliche dyadische Symmetrien sind auch an mutmaßlichen *hot-spots* für Rekombination beschrieben worden (Hyrien et al., 1987). Die Präinsertionssequenz p7 ist zudem auffallend reich an Konsensussequenzen (CTT, ACTT) für die eukaryontische DNA Topoisomerase I (Been and Champoux, 1984). Die Kombination von möglichen *stem loop* Strukturen und TopoI-Schnittstellen ist schon für andere Präinsertionssequenzen und Verknüpfungsstellen beschrieben worden (Übersicht in Knoblauch et al., 1996). Stromabwärts der Integrationsstelle liegt die Konsensussequenz einer DNA Topoisomerase II Schnittstelle (Spitzner and Muller, 1988). DNA Topoisomerase II schneidet den DNA-Doppelstrang und ist eine der Hauptkomponenten der Kernmatrix (Überblick bei Gasser and Laemmli, 1987). Dies ist bemerkenswert, da das terminale Protein, das kovalent mit dem 5'-Ende des Ad12 Genoms verknüpft ist, das virale Genom zur Kernmatrix lenkt (Schaack and Shenk, 1989; Schaack et al., 1990; Fredman and Engler, 1993).

3.7 Organisation des viralen Genoms in den Zellkernen infizierter Zellen

Über die Organisation des adenoviralen Genoms im Kern der infizierten Zelle gibt es noch kein klares Bild, doch offenbar kommt der Anheftung des viralen Genoms an die Kernmatrix eine wichtige Rolle zu. Wie bereits mehrfach erwähnt, ist das terminale Protein verantwortlich für eine feste Assoziation des adenoviralen Genoms mit der Kernmatrix. Interessanterweise sind gerade die Aminosäuren für die Assoziation verantwortlich, die in dem Teil des präterminalen Proteins liegen, der während der Reifung des Virions abgespalten wird. Sehr wahrscheinlich bleibt dieses N-terminale Fragment auch nach der Abspaltung mit dem terminalen Protein assoziiert (Schaack and Shenk, 1989). Eine Interaktion des präterminalen Proteins mit der Kernmatrix *in vitro* und *in vivo* ist später auch von anderen Gruppen bestätigt worden (Fredman and Engler, 1993). Eine der Komponenten der Kernmatrix, an die das präterminale Protein (pTp) bindet, scheint das Pyrimidinbiosyntheseenzym CAD zu sein (Angeletti and Engler, 1998). So konnte gezeigt werden, daß CAD mit pTP *foci* an der Kernmatrix kolokalisiert; darüber hinaus zeigten Bromdeoxyuridininkorporationsexperimente, daß die CAD-pTp *foci* mit Ad DNA Replikationszentren kolokalisierten. Auch die Arbeiten anderer Gruppen legen nahe, daß Enzyme zur dNTP-Synthese mit der Replikationsmaschinerie verknüpft sind (Harvey and Pearson, 1988; Reddy and Fager, 1993). Die Expression des CAD steht in Beziehung mit der Zellteilungsrate, die CAD-Konzentration in Tumorzellen ist zwei- bis fünffach höher als in normalen Zellen und geht in ruhenden Zellen gegen Null (Boyd and Farnham, 1997; Yip and Knox, 1970). Ist dies auf indirekte Weise ein Grund für die Abhängigkeit der adenoviralen Integration von der Zellreplikation (Schick et al., 1976; Fanning and Doerfler, 1977) ? Erleichtert die Assoziation des terminalen Proteins an die Kernmatrix die Integration des Virusgenoms ? Bestimmt der Ort der Assoziation den Ort der möglichen Integration mit ?

Bislang ist unbekannt, ob weitere Regionen des Adenovirusgenoms mit der Kernmatrix interagieren. In früheren Arbeiten wurde aber berichtet, daß die *mitigator*-Sequenz des Ad12 *major late promoters* (MLP) eine Bindungsstelle für den multifunktionellen Transkriptionsfaktor YY1 enthält. Eine Bindung des Transkriptionsfaktors an dieses Element konnte nachgewiesen werden (Zock et al., 1993). Das 33 Nukleotide lange *mitigator*-Element ist verantwortlich für die Inaktivität des Ad12 MLP in Hamsterzellen (Zock and Doerfler, 1990). Überraschenderweise braucht das *mitigator*-Element eine intakte Topologie des Kerns, um seinen Effekt zu entfalten. In *in vitro* Experimenten zeigte der *mitigator* keinen negativen Effekt, wohl aber in intakten Zellkernen. Später wurde nachgewiesen, daß der Transkriptionsfaktor YY1 identisch ist mit dem Kernmatrixprotein NMP-1 (Guo et al., 1995). Möglicherweise gibt es also auch im Bereich des Ad12 MLP eine zumindest

vorübergehende Wechselwirkung der viralen DNA mit der Kernmatrix, die für die Regulation der Genaktivität von Bedeutung ist.

Es ist bislang nicht experimentell untersucht, ob es innerhalb des Adenovirusgenoms *matrix attachment regions* (MAR) gibt; DNA-Abschnitte im Genom, die an die Kernmatrix binden. In anderen Virussystemen, wie z.B. den humanen Papillomaviren, werden verschiedene große MARs im Genom der Viren angenommen (Tan et al., 1998). Bei der Analyse von möglichen MARs und SARs (*scaffold attachment regions*) sind grobe Gemeinsamkeiten festgestellt worden; diese Regionen sind in der Regel A/T-reich, bestimmte A- und T-haltige Motive treten gehäuft auf und sie umschließen Schnittstellen der DNA Topoisomerase II (Gasser and Laemmli, 1987). Eine Bestimmung von MARs nur anhand der Sequenz bleibt aber weiterhin schwierig (Rogozin et al., 2000).

Interessanterweise gibt es im Ad12 Genom nur wenige Konsensussequenzen für die DNA Topoisomerase II. Die einzige Sequenz innerhalb des Ad12 Genoms die ohne Fehlpaarung mit einer Konsensussequenz übereinstimmt, liegt im Bereich des PstI-D Fragments (siehe Anhang D). Kann diese Sequenz mit der Topoisomerase II an der Kernmatrix interagieren oder befindet sich in dieser Region eine *matrix attachment region*? Das PstI-D Fragment und das benachbarte PstI-E Fragment sind besonders häufig an Rearrangements der viralen DNA beteiligt (Orend et al., 1995), der Grund für diese Präferenz ist allerdings bislang unklar. Eine experimentelle Bestimmung von MARs ist möglich (Mirkovitch et al., 1984). Da das terminale Protein die virale DNA zur Kernmatrix lenkt, ist es möglich, daß die virale DNA vorzugsweise mit Sequenzabschnitten des Wirtsgenom interagiert, die nahe oder in MARs liegen. Oder sind umgekehrt diejenigen Abschnitte im Adenovirusgenom gehäuft an Rekombinationsprozessen beteiligt, die – wie die terminalen Fragmente - nahe der Matrix liegen?

Terminale und bestimmte rearrangierte interne Sequenzen wie das PstI-D Fragment und das PstI-E Fragment des viralen Genoms sind nicht nur bevorzugt an Rekombinationsprozessen beteiligt, sie unterscheiden sich auch im Grad ihrer Methylierung von den übrigen Abschnitten des viralen Genoms. Die DNA im Viruspartikel ist nicht methyliert (Günthert et al., 1976), die in das Wirtsgenom integrierte virale DNA wird jedoch schrittweise *de novo* methyliert (Sutter et al., 1978; Sutter and Doerfler, 1980; Kuhlmann and Doerfler, 1983; Toth et al., 1989; Toth et al., 1990; Orend et al., 1991). Die Methylierung beginnt dabei offenbar in internen Segmenten des Virusgenoms und schreitet von dort aus in beide Richtungen hin fort. Allein die äußersten terminalen Abschnitte bleiben hypomethyliert. Auch die *off-size* Fragmente, die die zelluläre und virale DNA an den Verknüpfungsstellen umfassen, bleiben auch nach mehrfachem Passagieren der Zellen hypomethyliert (Orend et al., 1991). Bei einer Untersuchung der Ad12-transformierten Zelllinie T637 und ihrer

Revertanten wurde beobachtet, daß auch die rearrangierten Ad 12 Sequenzen im T637 Genom un- oder hypomethyliert sind. Gerade diese rearrangierten Sequenzen sind in den revertanten Zelllinien verloren gegangen, im Gegensatz zu einigen der methylierten Sequenzen, die stabil integriert blieben (Orend et al., 1995).

3.8 Hinweise auf einen selektiven Integrationsmodus der adenoviralen DNA

Bisher gibt es keinen Hinweis darauf, daß die DNA von Adenoviren in eine bestimmte zelluläre Sequenz integriert (Übersicht Doerfler, 1982; Hilger-Eversheim and Doerfler, 1997). Die folgenden Beispiele belegen jedoch, daß die virale DNA nicht an beliebigen Stellen integriert wurde.

So erfolgte die Integration der Adenoviren Typ 2, 5 und 12 in den untersuchten Beispielen meist an Stellen im zellulären Genom, die transkriptionell aktiv waren (Übersicht Schulz et al., 1987; Knoblauch et al., 1996). Ein weiterer Hinweis auf einen selektiven Integrationsmodus von Ad12 ist die Beobachtung von Rosahl und Doerfler (1988), daß virale DNA in Ad12 infizierten menschlichen KB Zellen bevorzugt mit Chromosom 1 assoziierte.

Ferner sind auf Chromosom 1 Bereiche identifiziert worden, die häufig nach Infektionen mit Adenoviren brachen (McDougall, 1971; McDougall et al., 1972). Es gibt Hinweise darauf, daß solche instabilen Stellen, von denen einige mit Onkogenen überlappen (Yunis and Soreng, 1984; Berger et al., 1986, Yunis et al., 1987; Yunis, 1987; McAlpine et al., 1987) möglicherweise als bevorzugte Integrationsstellen für virale DNA gedient haben (Casey et al., 1986; Popescu et al., 1987).

In zwei von sieben Ad12 induzierten Hamstertumorzelllinien wurde während der Zellkultivierung eine Änderung des Ad12 Integrationszustandes hin zu einem Ad12 Restriktionsmuster beobachtet, das mit dem von drei anderen Tumorzelllinien Gemeinsamkeiten besaß. Dies könnte auf gleiche die Ad12 Genome flankierende zelluläre DNA Sequenzen hinweisen (Orend et al., 1994). Darüber hinaus beobachteten Kuhlmann und Doerfler (1982) in der Ad12-induzierten Hamstertumorzelllinie H313, die nach zweimaliger Tierpassage die Tumorzelllinie HT5 ergab, ein Ad12 Restriktionsmuster, das mit jenem Gemeinsamkeiten besaß, das später (Orend et al., 1994) für vier weitere Ad12 induzierte Hamstertumorzelllinien gefunden wurde. Auch anderen Mitarbeitern unserer Abteilung fielen sich gleichende Ad12 Restriktionsmuster in weiteren, unabhängigen Tumoren auf (U. Hohlweg, persönliche Mitteilung). Dies verdeutlicht, daß mehrmals unabhängig voneinander Zellen mit ähnlichen Ad12 Restriktionsmustern entstanden sind.

Die häufig beobachtete unmittelbare Nähe der integrierten viralen DNA zu repetitiven Elementen wird als Hinweis darauf gedeutet, daß die Rekombination von zellulärer

mit viraler DNA durch diese Elemente begünstigt wird. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, daß beispielsweise für Alu Elemente gezeigt wurde, daß sie an Rekombinationsreaktionen beteiligt sind (Wallace et al., 1991; Muratani et al., 1991). Ein Ad5/SV40 Hybridvirus integrierte in eines von drei hintereinander angeordneten Alu-Elementen (Romani et al., 1993). Alu-Elemente wurden auch nahe der Integrationsstelle von HPV 16 (Wagatsuma et al., 1990), Alu-ähnliche Elemente wurden nahe der Integrationsstellen adenoviraler DNA in T637 und T191 (Knoblauch et al., 1996) und T1111(2) (Lichtenberg et al., 1987) beobachtet. Zudem war adenovirale DNA in dem Hamstertumor T1111(2) von der Sequenz eines repetitiven endogenen Retrovirus (der IAP Sequenz) flankiert. Möglicherweise ist eine an diesem Locus erhöhte Rekombinationsfrequenz dafür verantwortlich gewesen, daß diese adenovirale DNA in der aus dem Tumor gewonnenen Zelllinie H1111(2) verloren ging (Lichtenberg et al., 1987) aber andererseits im Tumor in diesen Locus integriert wurde.

Die Beobachtung aufgreifend, daß die Genome bestimmter Viren bevorzugt in Regionen des Wirtsgenoms integriert sind, die in ihrer Basenzusammensetzung der Zusammensetzung des Virusgenoms entsprechen (Übersicht Rynditch et al., 1998), wurden die DNA-Fragmente aus DNA-Präparationen von Ad12- und Ad2-transformierten Zelllinien in präparativen Schwebedichtegradienten fraktioniert und die Position der adenoviralen DNA im Gradienten bestimmt.

Im Unterschied zu den relativ kleinen Genomgrößen der Retroviren und des Hepatitis C-Virus sind die adenoviralen Genome weitaus größer (Ad2: 35937 Bp, Ad12: 34125 Bp); oft findet man in Ad-induzierten Tumoren oder Ad-transformierten Zelllinien mehrere Kopien viraler Genomequivalente gemeinsam an einem chromosomalen Locus integriert. So können die adenoviralen Integrate selbst isochorenähnliche Regionen im Genom der Wirtszelle bilden. In diesen Fällen ist in den entsprechenden Schwebedichtegradienten ein starkes Signal in den Fraktionen zu erwarten, die der Basenkomposition des viralen Genoms entsprechen. Auch stehen nur sehr wenige nicht repetitive Präinsertionssequenzen zur Verfügung, die als Sonde verwendet werden können. Daher sind für die hier geschilderten Versuche Zelllinien ausgewählt worden, in denen nur Teile oder nur wenige Kopien des Adenogenoms integriert sind.

Die Ergebnisse der Schwebedichtegradientenzentrifugationen belegen, daß die Integration adenoviraler DNA nicht auf bevorzugte Isochorenfamilien beschränkt ist. In der Ad12-transformierten Zelllinie T637, den korrespondierenden Revertanten TR2 und TR12, in der Ad12-transformierten Zelllinie HA 12/7 und in der Ad2-transformierten Zelllinie HE5 ist die adenovirale DNA in AT-reiche Sequenzen integriert. Die Ergebnisse zur Zelllinie HE5 sind um so bemerkenswerter, da das Genom des Adenovirus Typ 2 sehr GC-reich ist (55,2%). In den dieser Dichte

entsprechenden Fraktionen ist jedoch keine virale DNA nachzuweisen, wohl aber in Fraktionen, die weitaus GC-ärmeren Fragmenten entsprechen. Auch die bekannten Präinsertionssequenzen, die den Integrationsorten der adenoviralen DNA in diesen Zelllinien entsprechen, deuten eine Integration in AT-reiche Regionen des Wirtsgenoms an.

Im Gegensatz dazu deuten die Ergebnisse der Schwebelichtegradientenzentrifugation zu den Tumoren T1111(2) und CLAC1 in Zusammenhang mit den bekannten Präinsertionssequenzen auf eine Integration in Regionen des Genoms, die in ihrer Basenkomposition der Zusammensetzung des Ad12 Genoms entsprechen. Interessanterweise sind gerade in den aus diesen Tumoren etablierten Tumorzelllinien adenovirale Integrate nach kurzer Passagezahl verloren gegangen (Lichtenberg et al., 1987; Orend et al., 1994). Demgegenüber ist die virale DNA in den Zelllinien T637, HA12/7 und HE5 über viele Passagen nicht verloren gegangen (, obwohl in der Zelllinie T637 unter bestimmten Umständen Revertanten beobachtet worden sind, die große Teile der integrierten Genomequivalenten verloren haben (Groneberg et al., 1978; Groneberg and Doerfler, 1979; Eick et al., 1983)). Beeinflusst also der Ort der Integration die Stabilität der integrierten DNA? Wird integrierte DNA in GC-reichen Regionen mit höherer Gendichte (Zoubak et al., 1996) nicht toleriert bzw. haben diese Zellen einen Selektionsnachteil? Wird demgegenüber integrierte DNA in AT-reichen Regionen mit geringerer Gendichte eher toleriert?

Im zellfreien System wird der Rekombinationsort durch homologe Wechselwirkungen einer terminalen Nukleotidsequenz mit kurzen Sequenzen im Partnermolekül bestimmt. Die p7-Präinsertionssequenz erwies sich im zellfreien System offenbar dadurch als geeignete Zielsequenz, weil ihre Basenzusammensetzung ähnlich der Basenzusammensetzung der linksterminalen Nukleotidsequenz des PstI-D Fragments war. Aus diesem Grund stieg die Wahrscheinlichkeit, geeignete kurze Homologien in p7 zu finden. Die Enden der Genome von Ad2 und Ad12 sind sehr AT-reich, die ersten bzw. die letzten 50 Basenpaare des Ad12 Genoms haben einen AT%-Gehalt von 72%, die entsprechenden Basenpaare des Ad2 Genoms haben einen AT%-Gehalt von 70%. Wie die Verknüpfungsstelle aus der Ad12-transformierten Tumorzelllinie T637 (Abbildung 28) zeigt, spielen offenbar auch bei der Integration adenoviraler DNA in das Wirtsgenom Wechselwirkungen der terminalen Nukleotide zu kurzen homologen Sequenzen in der Zielsequenz eine Rolle. Ähnlich wie im zellfreien System ist daher anzunehmen, daß die AT-reichen DNA Enden des Ad Genoms eine Präferenz für AT-reiche Abschnitte des Wirtsgenoms haben. Diese AT-reichen Abschnitte sind natürlich nicht nur auf AT-reiche Isochoren beschränkt, auch GC-reiche Isochoren sind von AT-reichen Sequenzen durchsetzt. So zeigen gerade GC-reiche Isochoren starke Fluktuationen in ihrer Basenzusammensetzung, da sich hier wahrscheinlich kodierende Sequenzen

mit hohem GC%-Gehalt und assoziierten *CpG islands* abwechseln mit AT-reichen Regionen, die die DNA mit der Kernmatrix verbinden (Bernardi, 2001).

Ähnlich wie im zellfreien System scheint auch die adenovirale DNA bei der Integration nicht allein auf die äußersten terminalen Nukleotidsequenzen angewiesen zu sein. Auch hier können etwas weiter innen liegende Sequenzen zur Verknüpfung herangezogen werden. So sind an der genannten Verknüpfungsstelle des Ad12-induzierten Tumors CLAC1 (Abbildung 28) 174 Bp der viralen DNA deletiert. Diese Region des Ad12 Genoms ist deutlich GC-reicher als die äußersten 50 Basenpaare und tatsächlich ist die Integrationsstelle im Tumor CLAC 1 deutlich GC-reicher (Tabelle 4).

In Analogie zum zellfreien System sind aber v.a. Verknüpfungen zu erwarten, an denen die äußersten terminalen Sequenzen des Ad Genoms beteiligt sind. Dann aber ist eine Integration in AT-reiche Regionen wahrscheinlicher als in GC-reiche Regionen.

Eine Möglichkeit, die die Ergebnisse der Schwebedichtegradientenzentrifugation beeinflusst haben könnte, ist die erhöhte Mutationsanfälligkeit des 5-Methylcytosins. 5-Methylcytosin kann durch eine spontane oxidative Desaminierung in eine Thyminbase umgewandelt werden. Dies entspricht einer Transition von G-C zu A-T. Die virale DNA im Viruspartikel ist nicht methyliert (Günthert et al., 1976) , wird aber nach Integration ins Wirtsgenom schrittweise (Kuhlmann and Doerfler, 1983) und zum Teil stark methyliert (Toth et al., 1989; Toth et al., 1990; Orend et al., 1991; Orend et al., 1994). Doch gibt es im Adenovirus Typ 12 Genom nur 1500 CpG Dinukleotide (im Einzelstrang), dies entspricht einem prozentualen Anteil von 4,4% (Sprengel et al., 1994). Eine starke Veränderung im GC-Gehalt ist bei fortgeschrittener Passagezahl also auch durch spontane oxidative Desaminierung nicht zu erwarten.

Die Ereignisse zu Beginn der Wechselwirkungen zwischen viraler und Wirtszell-DNA können nicht in transformierten Zellen untersucht werden, da diese Zellen das Produkt einer starken Selektion darstellen. Untersuchungen zur Rekombination zwischen viraler und zellulärer DNA in humanen Zellen, die produktiv mit Ad2 infiziert worden waren, legen nahe, daß schon sehr früh im Verlauf der produktiven Infektion – vor Beginn der viralen Replikation – Ad2 DNA kovalent mit zellulärer DNA verknüpft wird (Schick et al., 1976; Fanning and Doerfler, 1977; Baczko et al., 1978; Schick and Doerfler, 1978). Untersuchungen an dieser hochmolekularen Form der viralen DNA implizieren darüber hinaus, daß die virale DNA nur in eine sehr begrenzte Zahl an chromosomalen Orten integriert (Baczko et al., 1978; Doerfler et al., 1980) und daß bis zu 1000 Kopien der Ad2 DNA pro Zelle in der hochmolekularen Form vorliegen (Fanning and Doerfler, 1977). Daher wurde in dieser Arbeit auch damit begonnen, die genomische Lokalisierung viraler DNA in produktiv infizierten Zellen

zu bestimmen. Dazu wurden humane KB Zellen mit Ad2 infiziert und die DNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion gewonnen. Abbildung 26 zeigt das analytische Profil der DNA aus KB Zellen 20-22 h p.i., Abbildung 27 das Ergebnis der entsprechenden präparativen Schwebedichtegradientenzentrifugation. Eine massive nicht-isopyknische Integration adenoviraler DNA konnte nicht nachgewiesen werden. Eine isopyknische Integration der viralen DNA kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

4. Material

4.1 Chemikalien und allgemeines Material

4.1.1 Chemikalien

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, im Reinheitsgrad p.a. oder reinst bezogen.

Adenosintriphosphat	Amersham Pharmacia, Uppsala
Agarose	Seakem, Biozym Diagnostik, Hameln
Agarose Ultra Pure	Life Technologies, Paisley, Schottland
Ammoniumsulfat (ultrapure)	Schwarz/Mann Biotech, Orangeburg, New York, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen
Ampicillin, Natriumsalz	Grünenthal GmbH, Stolberg
Bacto-Agar	Difco, Detroit, Michigan, USA oder Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Yeast-Extract	Difco
Bromphenolblau	Sigma
Caesiumchlorid	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue	Sigma
Desoxyribonukleosid-5'-phosphate	Promega, Madison, USA
Dextransulfat, Na-Salz	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
DL-Dithiotreitol (DTT)	Sigma
Dodecylsulfat, Na-Salz (SDS)	BioRad Laboratories, Richmond, Virginia, USA
Dodecylsulfat-Lösung (20%)	BioRad
Ethidiumbromid	Carl Roth KG, Karlsruhe

N-2-Hydroxyethylpiperazin-	Sigma
N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	
Heringssperma-DNA, Natriumsalz	Sigma
Magermilchpulver „Glücksklee“	Nestle Deutschland AG, Frankfurt
2-Mercaptoethanol	Carl Roth KG, Karlsruhe
Milchpulver (für Western Blot)	Carl Roth KG
Phenol	J.T.Baker Chemicals, Deventer, Niederlande
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphocreatine	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Rinderserumalbumin - für Bradford-Eichgerade -	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Saccharose (Sucrose, ultrarein)	ICN Biomedicals Inc., Cleveland, Ohio, USA
Sephadex G-50	Amersham Pharmacia
Seren Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco
Spermidin	Sigma
Spermin	Sigma
Tetracyclin	Sigma
Tris[hydroxymethyl]aminomethan	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA oder Sigma
Triton-X-100	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma
Xylencyanol FF	Fluka AG
Zinkchlorid	Sigma

4.1.2 Allgemeines Labormaterial

Bakterieninkubator	Memmert, Schwabach
Bakterienschüttler Modell 625	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA
Biotrap-Elutionskammer	Schleicher&Schüll, Dassel
Blaukappröhrchen, 50ml	Becton Dickinson
Corex-Röhrchen	DuPont Instruments
Dialyseschläuche	Medicell International, London, UK
ECL <i>Western blotting detection system</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA, Mortsel, Belgien
Filtereinheiten	
Membrex BT 125ml System (0.2? m)	Membrapure GmbH, Lörzweiler
Einmal Filterhalter Membrex 18 (0.2? m)	Membrapure
Einmal Filterhalter FP030/2 (0.45? m)	Schleicher&Schüll
FPLC-Anlage/ -Fertigsäulen	Amersham Pharmacia Biotech
Geltrockner Modell 224	BioRad
Gewebekulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Becton Dickinson (Falcon), Oxnard, USA
Gradientenmischer	Werkstatt der Genetik, Köln
Hamilton Spritze	Hamilton Company, Reno, Nevada
Haushaltsfolie	Melitta, München
Homogenisatoren	Braun, Melsungen
Typen „S“, „L“; 15 und 30 ml	
Hybridisierungsröhrchen	Bachhofer, Reutlingen Gaithesburg, MD, USA
Nylonmembranen, positiv geladen und ungeladen	Pall Macherey&Nagel, Düren
Papierhandtücher „pro natur“	Amandi-Hygienepapier GmbH, Mainz-Kostheim
Parafilm „M“	American Can Company, Greenwich, Connecticut, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Perkin Elmer
pH-Einstabmesskette 405	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin
Photometer DU 640	Beckman

Polyacrylamidlösung rotiphorese Gel 30	Roth
Proteingel-Elektrophoresekammer	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Kalifornien, USA (jetzt: Amersham Pharmacia)
PVDF-Transfermembran Hybond P	Amersham Pharmacia Biotech
Reaktionsgefäße, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme X-OMAT™ AR 5 und BIOMAX™ MR	KODAK, Stuttgart
Röntgenfilmkassetten	Suprema Filmkassetten
Sequenzierautomat 377	Perkin Elmer
„Sonifier B-12“	Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA
Sterilbank	The Baker Co. Inc., Sanford, Maine, USA
Szintillationszähler (LS 1801)	Beckman Instruments Inc. Palo Alto, Kalifornien, USA
Videodokumentationssystem (CS 1)	Cybertech, San Gabriel, USA
Western Blot – Kammer „Trans-Blot“	BioRad
„Whatman“-Papier	Schleicher&Schüll
Weißkappröhren, 10ml	Greiner, Frickenhausen
Zählkammer (Neubauer)	Brand, Wertheim
Zentrifugen	
Laborzentrifugen	
J2-21	Beckman
Biofuge „pico“	Heraeus, Osterode
Labofuge GL	Heraeus
Medifuge 13000	Heraeus
RC-5B	Sorvall
Cryofuge 5000	Heraeus
Ultrazentrifuge	
L8 55M	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA
Zentrifugenröhrchen für Ultrazentrifugen	Beckman Instruments Inc.

4.2 Material und Geräte zur Gleichgewichtszentrifugation

Alle Dichtegradientenzentrifugationen wurden in der Abteilung *Evoluzione Molecolare* der Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli durchgeführt.

Agarose, <i>pulse field certified</i>	BioRad
Cäsiumchlorid, <i>optical grade</i>	Sigma
DNA-Größenmarker zur Pulsfeldgelelektrophorese <i>low range PFG Marker</i>	New England Biolabs
Dichtegradientenfraktionssammler D6F-U mit angeschlossener peristaltischer Pumpe Minipuls 3	Hitachi, Japan Gilson, Frankreich
Geldokumentationssystem GelDoc2000	Biorad
Mikroquarzküvetten (10µl)	Perkin Elmer
Photometer Lambda Bio 40	Perkin Elmer
pulse field Gelelektrophoresesystem „ChefMapper“	Biorad
Refraktometer (mit Temperaturfühler)	Analysen Technik Geräte (ATG), Deutschland
Ultrazentrifuge Optima XL 100K	Beckman
analytische Ultrazentrifuge Optima XL-A	Beckman
Ultrazentrifugationsröhrchen <i>Quickseal</i>	Beckman

4.3 Enzyme

4.3.1 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von Roche, MBI Fermentas oder New England Biolabs bezogen.

Die Inkubation folgte den von den Herstellern genannten Bedingungen, jedoch wurde kein BSA zugesetzt.

4.3.2 Sonstige Enzyme

„Klenow“-Fragment der DNA-Polymerase I Lysozym (aus Hühnereiweiß) [EC 3.2.1.17]	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, Kalifornien, USA
Proteinase K [EC 3.4.21.14]	Merck
Ribonuklease A [EC 3.1.27.5]	Sigma
Taq-Polymerase	Promega, Madison, USA
Trypsin	Worthington Biochemical Corp., England

4.4 Radioisotope

Desoxyribonukleosid 5' [³² P]- triphosphate spez. Aktivität >3000 Ci/mmol	DuPont New England Nuclear Boston, MA, USA
---	---

4.5 Kits

Transformations-Kit („Epicurian Sure [®] 2 Supercompetent“-Bakterienstamm“)	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA
„Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing“ Kit	Applied Biosystems
„ABI PRISM [™] Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“ Kit	Perkin-Elmer
QiaExII Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QiaQuick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi/Midi/Mini-Kit	Qiagen, Hilden

4.6 Lösungen und Medien

Alle Lösungen wurden mit über Ionenaustauschern (Millipore SuperQ Water System) gereinigtem Wasser angesetzt. Gegebenenfalls wurden die Lösungen durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert.

Allgemeine Lösungen

Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie Brillant Blue G-250 4,7 % (v/v) Ethanol 8,5 % (v/v) Phosphorsäure
Chloroform (für Phenol/Chloroform-Extraktionen)	im Verhältnis 24:1 mit Isoamylalkohol gemischt
Desoxyribonukleosid-5'- triphosphate	10 mM in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 oder in dest. Wasser
Ethidiumbromidlösung für DNA-Gele	2 mg/l in TBE
„Oligo-labeling“-Puffer (OLB, 10x)	1 mM DTT 100 mM MgCl ₂ 500 mM Tris-HCl, pH 7,2 2mg/ml BSA 250µg/ml „random primer“ (dN ₆)
PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	140 mM NaCl 3 mM KCl 1 mM KH ₂ PO ₄ 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 1 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O
PBS-d	PBS ohne CaCl ₂ und MgCl ₂
Phenol	gesättigt mit 0,1 M Tris-HCl; pH 7,8

PMSF-Stammlösung	100 mM in 2-Propanol
Proteinase K-Stammlösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl , pH7,5
Proteinase K-puffer	100 mM Tris-HCl, pH8,5 5 mM EDTA 0,5 % SDS 200 mM NaCl
SSC („sodium saline citrate“) - 1x	150 mM NaCl 15 mM Natriumcitrat
TBE (1x)	100 mM Tris-HCl; pH 8,3 89 mM Borsäure 25 mM EDTA; pH 8,0
TE	10 mM Tris-HCl; pH 7,5 1 mM EDTA
TEN	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl; pH 8,0 1 mM EDTA; pH 8,0
Tris-Saline	137 mM NaCl 5 mM KCl 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ 25 mM Tris-HCl 0,1 % Glukose 0,03 % Penicillin 0,015 % Streptomycin

Lösungen zum „Southern Blotting“

Church-Puffer	1% BSA 1 mM EDTA 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,2 7% SDS
Denaturierungslösung	0,4 M NaOH
Depurinierungslösung	0,25 M HCl
Dextransulfat	50 % (w/v) in H ₂ O
Hybridisierungslösung	2 x SSC 20 % Dextransulfat 10 % (v/v) Milchpulver-Mix 0,17 mg/ml Heringssperma-DNA
Heringssperma-DNA	10 mg/ml in TE
Milchpulver-Mix	50 % (w/v) SDS 5 % (w/v) Milchpulver
Prähybridisierungslösung	2 x SSC 10 % (v/v) Milchpulver-Mix 0,17 mg/ml Heringssperma-DNA
Waschlösung I	2 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
Waschlösung II	0,1 x SSC 0,1 % (w/v) SDS

Lösungen für „QIAGEN“-DNA-Präparationen

Lösung E1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCl; pH 8,0 10 mM EDTA 0,1 mg/ml RNase
Lösung E2 (Zellyse)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Lösung E3 (Neutralisierung)	3,2 M Kaliumacetat; pH 5,5
Lösung E4 (Säulenequilibration)	600 mM NaCl 100 mM Natriumacetat; pH 5,0 0,15 % Triton-X-100
Lösung E5 (Säulenwaschlösung)	800 mM NaCl 100 mM Natriumacetat; pH 5,0
Lösung E6 (Elutionspuffer)	1250 mM NaCl 100 mM Tris-HCl; pH 8,5

Lösungen für DNA-Minipräparationen

Lysozymbilösung	10 mg/ml Lysozym in TE
STET-Lösung	50 mM Tris-HCl; pH 8,0 50 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton-X-100 8 % (w/v) Saccharose

Lösungen für die Koloniehybridisierung

Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
----------------------	--------------------------

Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl; pH 8,0
Fixierungslösung	0,4 M NaOH
Waschlösung A	2 xSSC 0,2 M Tris-HCl; pH 8,0
Waschlösung B	5 x SSC

Lösungen und Medien zur Bakterienkultur

Ampicillin (Stammlösung)	50 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenicol (Stammlösung)	34 mg/ml in Ethanol
CMN-Lösung	100 mM CaCl ₂ 85 mM MnCl ₂ 40 mM Natriumacetat; pH 6,8- 7,0
Glycerinlösung (zum Aufbewahren von Bakterienkulturen)	65% (v/v) Glycerin 0,1 M MgSO ₄ 0,025 M Tris; pH 8
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 1,25 % (w/v) Agar
NZY-Medium	1 % (w/v) NZ-Amine 0,5 % (w/v) Hefeextrakte 0,5 % (w/v) NaCl Supplemente: 1,25 ml 1M MgCl ₂ ; 1,25 ml 1M MgSO ₄ und

	2 ml einer 20 % (w/v) Glucoselösung/ 100 ml NZY
Tetracyclin (Stammlösung)	5 mg/ml in Ethanol
2 x TY	1,6 % (w/v) Bacto-Trypton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl

Lösungen und Medien für die Zellkultur

Dulbecco modifiziertes Medium	Bablanian et al., 1965
Tris-Saline	14 mM NaCl 5 mM KCl 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ 25 mM Tris-HCl; pH 7,4 0,1 % (w/v) Glucose 0,03 % (w/v) Penicillin 0,02 % (w/v) Streptomycin
Trypsinlösung	0,25 % in Tris-Saline

Puffer für die Präparation und Reinigung von Kern-Extrakten

FPLC-Puffer A	Puffer D
FPLC-Puffer B	Puffer D mit 2 M NaCl
Puffer A (Lysispuffer)	10 mM HEPES; pH 7,9 0,75 mM Spermidin 0,15 mM Spermin 0,1 mM EDTA; pH 8,0 0,1 mM EGTA; pH 8,0 1 mM DTT 10 mM KCl

Puffer B (Saccharose-Salz-Puffer)	9/10 75 % (w/v) Saccharose-Lösung 1/10 10 x Salzpuffer
10 x Salzpuffer	500 mM HEPES; pH 7,9 7,5 mM Spermidin 0,15 mM Spermin 100 mM KCl 2 mM EDTA; pH 8,0 10 mM DTT
Puffer C (Extraktionspuffer)	25 % (v/v) Glycerin 20 mM HEPES; pH 7,9 0,75 mM Spermidin 0,15 mM Spermin 0,2 mM EDTA; pH 8,0 2 mM EGTA; pH 8,0 2 mM DTT
Puffer D (Dialysepuffer)	20 % (v/v) Glycerin 20 mM HEPES; pH 7,9 150 mM NaCl 0,2 mM EDTA; pH 8,0 0,2 mM EGTA; pH 8,0 2 mM DTT 1 mM PMSF
Puffer für die SDS/Polyacrylamidgel-Elektrophorese	
SDS-Elektrophoresepuffer (1x)	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (1x)	50 mM Tris-HCl; pH 6,8 2 % (w/v) SDS 4 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau

Tris/SDS-Puffer (4x); pH 8,8
375 mM Tris-HCl; pH 8,8
0,1 % (w/v) SDS

Tris/SDS-Puffer (4x); pH 6,8
125 mM Tris-HCl; pH 6,8
0,1 % (w/v) SDS

Lösungen zur Färbung von Polyacrylamidgelen

Silberfärbung

Fixierungslösung
12% (w/v) Trichloressigsäure/
50% (v/v) Methanol

Färbelösungen
1% (w/v) CuCl_2 /
12% (w/v) Trichloressigsäure/
50% (v/v) Methanol

0,004% (w/v) KMnO_4 -Lösung

0,1% (w/v) AgNO_3 -Lösung

Entwickler
10g K_2CO_3 und
100 μl 37%iges Formaldehyd
auf 500 ml dest. Wasser

Coomassiefärbung

kombinierte Färb- und Fixierungslösung
Brilliant
0,2%-0,5% (w/v) Coomassie
Blue R-250
45% (v/v) Methanol
7% (v/v) Essigsäure

Entfärbelösung
5% (v/v) Methanol
7% (v/v) Essigsäure

Proteinstandardmarker

„Benchmark Protein Ladder“ (9.3 – 172.6 KDa)

LifeTechnologies

Lösungen zum „Western Blotting“

Blockpuffer 1

5% Milchpulver

1xTBS

0,05 – 0,1 % Tween 20

Blockpuffer 2

2,5% Milchpulver

1xTBS

0,05 – 0,1% Tween 20

Blotpuffer, 10fach-Stammlösung

1,92 M Glycin

0,25 M Tris-Cl; pH 8,3

1xTBS

0,1 M Tris-Cl pH 8,0

0,15 M NaCl

Waschpuffer (TBS-T)

1xTBS

0,05% Tween 20

4.7 Antikörper zum „Western Blot“

Ku-70 (M-19), sc-1487

Santa Cruz Biotechnology, USA

bovine anti-goat, sc-2352

Santa Cruz Biotechnology

4.8 Zelllinien, Viren, Bakterienstämme und Plasmid-DNA

4.8.1 Zelllinien

KB-Zellen, human	ATCC, Nr.: CCL 17
HeLa	ATCC, Nr.: CCL 2
BHK21-C-13 (Nierenzellen neugeborener Hamster)	ATCC, Nr.: CCL 10
T637 (Ad12 transformierte Hamsterzelle)	Strohl et al., 1970
TR2	Groneberg et al., 1978
TR12	Groneberg et al., 1978
CLAC1	Stabel et al., 1980
HE5	Cook and Lewis, 1979

4.8.2 Viren

Adenovirus Typ 12 (Ad12)	ATCC, Nr.: VR 863
Adenovirus Typ 2 (Ad2)	Geschenk von Otilia Vieira Breitwieser; Köln

4.8.3 Bakterienstämme

HB101/LM1035	Geschenk von Renate Deuring, Santa Cruz, Kalifornien, USA
„Epicurian Sure [®] 2 Supercompetent“	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA
MC 1061	Geschenk von Jennifer Hertz, Köln

4.8.4 Plasmid-DNA

pBR322 (Bolivar et al., 1977)

ursprünglich ein Geschenk von

W.Goebel, Würzburg

pBluescript II KS(+)

Stratagene

4.9 Primer

4.9.1 Primer für die Nukleotidsequenzbestimmung

primer 1:

5'-AAC AGT CAA GCT TGT ACT CC-3'

primer 2:

5'-GGT AGT GGG CAC ATT GC-3'

primer 3:

5'-ACA CGC TGC CCT GAT CCG G-3'

primer 4:

5'-GAA CTT GGG CTA CGA GAC T-3'

primer 5:

5'-GCA GTG CCA GAA GCA CTG GC-3'

primer 6:

5'-CCA TGG CTA CGT GCG CCA AGC-3'

primer 7:

5'-ATG GGT GTT TGG CAG CAA TGC-3'

4.9.2 Primer für den PCR-Rekombinationsassay:

Name des Primers	Sequenzkoordinaten	Sequenz
D100-120	PstI-D nt. 100-120	5'-gta gca tac aat tag gca ccc-3'
p7-1766	pBR322p71766-1786	5'-gtc ctt cgt aga gga tcc atc-3'
D58-81	PstI -D nt. 58-81	5'-tgg gat ttt tat cca ttg gat gg-3'
p7-1640	pBR322p7 1636-1616	5'-gaa agt gca ctc agc gac aag g-3'

4.9.3 Primer zur Isochorenanalyse:

Name des Primers	Position	Sequenzkoordinaten	Sequenz
L1	PstI-L-fragment of ad12	nt. 33028-33046	5'-cca cac ctt ggt cgc gca g-3'
L2	PstI-L fragment of ad12	nt. 33398-33416	5'-cac ccg ttt gcc agg cat c-3'
F5-1	preinsertion site T637 os2	nt. 873-893	5'-gct gtg cca gtc cct tac ag-3'
F5-2	preinsertion site T637 os2	nt. 1072-1093	5'-gat gtc aga tac atc cag gta g-3'
ad2-1	left terminus of the ad2 genome	nt. 476-495	5'-ccg gtg agt tcc tca aga gg-3'
ad2-2	left terminus of the ad2 genome	nt.899-879	5'-ttt ggc ata gaa acc gga ccc-3'
E4-1	E4 region of the ad12 genome	nt.32931-32961	5'-gcc atc cgc agg cag tac ttc-3'
E4-2	E4 region of the ad12 genome	nt.33359-33337	5'-aag cat gtt tca gag gtc gct tg-3'

Die angeführten Sequenzkoordinaten beziehen sich auf die veröffentlichten Sequenzdaten (*GenBank accession numbers*: Ad12 Genom: X73487; Ad2 Genom: J01917; Präinsertionssequenz in BHK21: X87240).

5. Methoden

5.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden stets unter einer Sterilbank durchgeführt. Die für diese Arbeiten notwendigen Lösungen wurden im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

5.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Zellen

„Monolayer-Kultur“

Die verwendeten Zellen wurden in 75 cm² oder in 175 cm² Gewebekulturflaschen aus Kunststoff bei 37°C vermehrt. Die Zellen wuchsen, je nach Zelllinie, in 2-3 Tagen zu einem konfluenten Zellrasen und wurden dann wieder neu ausgesät.

In eine neue Gewebekulturflasche wurden 40 ml oder 75 ml Dulbeccos modifiziertes Medium (Bablanian et al., 1965) vorgelegt, das 10% fötales Kälberserum enthielt. Um konfluent gewachsene Zellen auf neue Gewebekulturflaschen auszusäen, wurde zunächst das alte Medium vollständig abgegossen und die Zellen zweimal mit PBS-d gewaschen. Anschließend wurden sie mit etwa 1 ml Trypsinlösung versetzt und nach kurzer Inkubationszeit durch leichtes Klopfen an die Gefäßwandung abgelöst. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und ein Aliquot, je nach Zelltyp 10% bis 20% der Zellsuspension, wurde in die vorbereitete Gewebekulturflasche überführt.

Die ausgesäten Zellen wurden in geschlossenen Gewebekulturflaschen bei 37°C inkubiert.

5.1.2 Kultivierung von Zellen in Suspension

„Spinner-Kultur“

HeLa oder KB Zellen wurden in Suspensionskultur in Joklik modifiziertem MEM-Medium (*minimal essential medium*) mit 5% Serum neugeborener Kälber unter ständigem Rühren bei 37°C in Kultur gehalten. Die Zelldichte wurde regelmäßig bestimmt und sollte sich zu jedem Zeitpunkt zwischen 1×10^5 und 1×10^6 befinden, um optimale Wachstumsbedingungen zu bieten. Um dieses zu gewährleisten, wurden die Zellen täglich oder alle zwei Tage verdünnt.

5.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Bei adhären wachsenden Zellen wurden diese zuvor abgelöst und zweimal mit Tris-Saline gewaschen und in etwas Tris-Saline resuspendiert, bei in Suspension wachsenden Zellen wurde direkt die Zellsuspension verwendet. Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Beim Aufsetzen des befeuchteten Deckglases wurde darauf geachtet, daß Newtonsche Ringe zu erkennen waren, so daß ein definierter Abstand gegeben war. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde an den Rand der Zählkammer gegeben, der durch die Kapillarkräfte in die Zählkammer gesaugt wurde. Es wurden vier große Quadrate der Zählkammer ausgezählt, wobei ein großes Quadrat aus 16 kleineren Quadraten bestand. Nach der Bestimmung des Mittelwertes der großen Quadrate ergab sich die Zellzahl pro Milliliter aus folgender Formel:

$$\text{Gesamtzahl der Zellen} = \text{Mittelwert} * x \text{ ml} * 10^4.$$

5.1.4 Zellproduktion im Rührreaktor mit blasenfreier Begasung

siehe Diplomarbeit Gerd Wronka

5.2 Virusvermehrung und Virusreinigung

(Green und Piña, 1964; Doerfler, 1969)

5.2.1 Infektion von Zellkulturen mit Adenovirus Typ 12

5.2.1.1 Adhären wachsende Zellen

Aus Gewebekulturflaschen, die etwa halbkonfluent mit HeLa oder KB Zellen bewachsen waren, wurde das alte Medium vollständig abgegossen, anschließend wurde in jede Flasche frisches Medium (ohne Serum) gegeben (etwa 1/10 der ursprünglichen Menge). In diesem Volumen wurden die Zellen mit etwa 20-30 PFU pro Zelle inokuliert und zur Adsorption der Virionen 2 h bei 37°C und gelegentlichem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde mit frischem Medium (mit 10% fötales Kälberserum) auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt.

5.2.1.2 In Suspension wachsende Zellen

Um Zellen, die in Suspensionskultur wuchsen, zu infizieren, sind diese 20 min bei 1800 UpM (Heraeus, Cryofuge 5000) und 37°C zentrifugiert worden. Das Zellsediment wurde in 10% des Endvolumens in Joklik-Medium aufgenommen und mit etwa 20-30 PFU inokuliert. Zur Adsorption der Virionen wurde die Zellsuspension 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Joklik-Medium mit 5% Serum neugeborener Kälber auf das Endvolumen aufgefüllt, in dem die Zelldichte etwa $2-3 \times 10^5$ Zellen pro Milliliter nach der Infektion betragen soll.

5.2.2 Ernte der Zellen

Mit Ad12 infizierte HeLa- oder KB-Zellen konnten nach einer Inkubationszeit von 72 h geerntet werden.

5.2.2.1 Adhärenz wachsende Zellen

Adhärenz wachsende Zellen zeigten nach einer erfolgreichen Infektion nach 72 h einen cytopathischen Effekt (CPE), bei dem ein großer Teil der Zellen abgerundet war und sich perlschnurähnlich vom Boden der Gewebekulturflasche zu lösen begann.

Zur Ernte wurden die Zellen durch leichtes Klopfen an die Gefäßwandung abgelöst oder mit einem Gummischaber vorsichtig abgelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugengefäß überführt und die Gewebekulturflasche einmal mit Tris-Saline (4°C) nachgewaschen. Die Waschlösung wurde ebenfalls in das Zentrifugengefäß überführt. Die Zellsuspension wurde auf Eis gekühlt.

5.2.2.2 In Suspension wachsende Zellen

Die Zellsuspension wurde direkt in ein Zentrifugengefäß überführt.

5.2.3 Virusisolierung

Die Zellsuspension wurde 20 min bei 1800 UpM (Heraeus, Cryofuge 5000) und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment von jeweils einem Liter Zellsuspension wurde in 3 ml Tris-Saline resuspendiert. Es besteht die Möglichkeit, den sogenannten Rohextrakt für unbestimmte Zeit bei -20°C zu lagern. Zur weiteren Aufbereitung wurde der Rohextrakt 3 x 15 sec bei 70 Watt in einem Eisbad sonifiziert, um die Zellen aufzubrechen. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 5700 x g (Wifug, Stufe 3) und 4°C sedimentiert.

Die im Überstand enthaltenen Virionen können durch eine Gleichgewichtszentrifugation im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten gereinigt werden. Dazu wurde der Überstand in *Ultra Clear*-(SW 60) - Zentrifugenröhrchen überführt und mit 0,5 g Cäsiumchlorid pro Milliliter Lösung versetzt. Zum Trieren wurde eine Cäsiumchloridlösung mit einem Brechungsindex von $n = 1,3668$ verwendet. Die Gleichgewichtszentrifugation erfolgte in einer Beckman-Ultrazentrifuge für mindestens 16 h bei 40.000 UpM und 4°C. Anschließend konnte die Bande in der die Virionen angereichert waren durch Austropfen gewonnen werden. Die Virionenbanden waren mit bloßem Auge im sichtbaren Licht zu erkennen. Sollte DNA aus den Virionen gewonnen werden, wurde die Schwebedichtegradientenzentrifugation unter gleichen Bedingungen noch zweimal wiederholt.

5.2.4 Bestimmung der Konzentration und der Infektiösität des gewonnenen Inokulums

Die Konzentration der Viruspartikel in Lösung kann durch Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm mit einem Spektralphotometer bestimmt werden. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 etwa 10^{10} PFU/ml (Burlingham und Doerfler, 1971). Diese Definition gilt nur für frische Präparationen.

Um verschiedene Inokula vergleichen zu können, wurde die Infektiösität zusätzlich auf HeLa-Zellen getestet. Die geringste Menge an Inokulum, welche in der Lage war, einen vollständigen CPE hervorzurufen, wurde auch als Grundlage für weitere Infektionen herangezogen.

5.3 Präparation adenoviraler DNA

5.3.1 Aufschließen der Virionen

Zur DNA-Präparation aus Virionen, die über einen Cäsiumchloridgradienten gereinigt worden waren, wurde die Virionensuspension über Nacht bei 4°C gegen mehrere Liter TE dialysiert. Zu dem Dialysat wurde 1/10 des Volumens Proteinase K (10mg/ml) und 1/10 des Volumens 10%ige SDS-Lösung (ultrarein) gegeben und 2-3h bei 37°C inkubiert.

5.3.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion wurden Nukleinsäuren von Proteinen und Lipiden getrennt. Das Volumen der zu reinigenden DNA-Lösung wurde einmal mit dem gleichen Volumen Phenol, zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Nach Bildung einer Emulsion wurde jeweils zur Phasentrennung 5 min bei 3000 UpM (TC6) bei RT zentrifugiert. Die nukleinsäurehaltige, wäßrige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.3.3 Ethanolfällung von DNA

(Meyers et al., 1976)

Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und von 2,5fachem Volumen absoluten, kalten (-20°C) Ethanols wurde DNA bei -20°C präzipitiert. Die Inkubationszeit betrug dabei mindestens 30 min. In Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen führt Ethanol zu strukturellen Änderungen in Nukleinsäuremolekülen, die sie aggregieren und aus der Lösung ausfallen lassen (Eickbrush und Moudrianakis,1978). Das Präzipitat wurde bei 4°C und 13.000 UpM mindestens 30 min abzentrifugiert, einmal mit 70% Ethanol gewaschen und unter Vakuum oder an der Luft getrocknet. Die DNA wurde anschließend in TE oder in H₂O resuspendiert und bei 4°C bzw. -20°C gelagert. Waren die DNA-Lösungen sehr verdünnt, oder lag wie bei der *in vitro* Rekombinationsreaktion weniger als 1 µg DNA vor, wurde das dreifache Volumen an absolutem Ethanol zugegeben und mindestens 30 min bei -80°C inkubiert.

5.3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Nukleinsäuren und Proteine haben Absorptionsmaxima im ultravioletten Bereich des Spektrums. Man mißt die relative optische Dichte der Lösung bei 260 nm (Nucleobasen) und 280 nm (aromatische Aminosäuren) bei 10 mm Schichtdicke in einer Quarzküvette. Für reine Nukleinsäure gilt:

$$OD_{280}/OD_{260} \approx 0,49.$$

5.4 Präparation genomischer DNA

Konfluente Zellmonolayer aus 175 cm² - Kulturflaschen wurden jeweils zweimal mit Tris-Saline gewaschen und durch Behandlung mit Tris-Saline und 2 mM EDTA abgelöst. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Tris-Saline/EDTA gewaschen, um dann in einem geeigneten Volumen Proteinase K-Puffer aufgenommen zu werden. Die Zellen wurden mit 1/10 Volumen Proteinase K (10 mg/ml) und 1/10 Volumen 10% SDS bei 55°C für etwa 16 h inkubiert. Die genomische DNA wurde am nächsten Tag durch Phenol-Chloroformextraktion gereinigt. Dabei war die Oberphase durch Zugabe einer Silikonschicht (Baysilon, mittelviskos; Bayer, Leverkusen) von Interphase und Unterphase getrennt. So konnte die Oberphase durch einfaches Abschütten von der Interphase getrennt werden. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, in TE aufgenommen und bei 4°C gelagert.

5.5 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Fragmentgröße der präparierten genomischen DNA wurde mit Pulsfeldgelelektrophorese (*pulse field gel electrophoresis* - PFGE) bestimmt. Dabei stand ein *ChefMapper*TM-Gerät der Firma BioRad zur Verfügung, zur Herstellung des Geles wurde *PFGE-certified agarose* (BioRad) verwendet. Nachdem das Agarosegel in der dafür vorgesehenen Plattform fest geworden war, wurde der Gelkamm entfernt und die DNA-Lösung in die Geltaschen eingefüllt, pro Tasche etwa 1 µg DNA in 15 µl TE. Anschließend wurden die Geltaschen mit noch flüssiger Agarose geschlossen. Später wurde das Gel in die Elektrophoresekammer mit 1xTBE als Elektrophoresepuffer gelegt. Die Parameter für die Pulsfeldgelelektrophorese wurden der Größe der Fragmente entsprechend gewählt: ca. 277 mA, 6 V/cm, jeweilige Pulsdauer: 30 sek bei einem Winkel von +/- 60° bei 14°C für 17:33 h.

5.6 Schwebedichtegradientenzentrifugation

5.6.1 Analytische Schwebedichtegradientenzentrifugation

Die analytischen Schwebedichtegradientenzentrifugationen wurden in einer Beckman Optima XL-A Ultrazentrifuge durchgeführt. In jeder Zelle des Rotors (An 50Ti) wurden ca. 1 µg der jeweiligen genomischen DNA zusammen mit ca. 1 µg DNA des Bakteriophagen 2c bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands bei 44000 UpM bei 20°C zentrifugiert (22-24h). Die DNA des Phagen 2c diente dabei als Schwebedichtenmarker. Der Probenpuffer enthielt 0,005 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,6, der CsCl-Gehalt des Puffers wurde mit einem Refraktometer so eingestellt, daß eine Dichte von 1,4020 gcm⁻³ erreicht war. Das Füllen, Justieren und Einsetzen der Probenzellen wurde dabei immer von Salvatore Bocchetti, Stazione Zoologica „Anton Dohrn“, Napoli, durchgeführt. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurde die DNA-Verteilung im Gradienten während des Laufes gemessen und durch geeignete Software (Beckman XL-A) graphisch dargestellt.

5.6.2 Präparative Schwebedichtegradientenzentrifugation

Die zur Zentrifugation eingesetzte DNA/CsCl-Lösung hatte einen Brechungsindex von $n_D=1,3993-1,3994$. Um diese Lösung zu erhalten, wurde zunächst eine CsCl-Lösung mit diesem Brechungsindex angesetzt. In der Regel wurden dazu 6,28 g CsCl (*optical grade*) eingewogen und in 5 ml TE gelöst, anschließend wurden solange CsCl oder TE in kleinen Mengen zugegeben, bis der genannte Brechungsindex erreicht war.

Zu etwa 4 ml dieser Stammlösung wurden nun 5-30 µg genomische DNA zugegeben; der Brechungsindex wurde erneut durch Zugabe von wenig CsCl auf $n_D=1,3993-4$ eingestellt. Das Zentrifugationsgefäß wurden nun mit der CsCl-Stammlösung aufgefüllt und zugeschweißt.

Die Zentrifugation erfolgte in einem VTi90 Rotor bei 35000 UpM bei 20°C für 22-24 h. Nach erfolgtem Lauf wurden das Zentrifugationsröhrchen vorsichtig entnommen und die Kappe mit einer rotglühenden Klinge abgeschnitten. Der Gradient wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe von oben her abgezogen. Fluß und Fraktionsgröße wurden stets kontrolliert.

5.6.3 Analyse der durch isopyknische Zentrifugation fraktionierten DNA

Die so fraktionierte DNA wurde entweder durch die Dot-Blot-Technik und anschließende Hybridisierung mit spezifischen Sonden oder durch PCR analysiert.

Dot-Blot: Gleiche Volumina jeder Fraktion wurden mit einem Überschuß an 0,4 N NaOH verdünnt und mit einer Dot-Blot-Apparatur (Schleicher&Schuell oder Gibco) auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgebracht. Das Vorbereiten der Membran und das Fixieren der DNA geschah dabei nach Vorgaben des Herstellers. Anschließend wurde die DNA auf diesen Membranen mit ^{32}P - oder ^{33}P -markierten Sonden hybridisiert. Als Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung wurde stets Churchpuffer verwendet. Expositionen wurden mit einem Fuji X-BAS 1000 Phosphoimager aufgenommen und mit geeigneten Programmen (PCBAS 2.09, raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) ausgewertet.

PCR-Analyse: Um das Caesiumchlorid aus den Ansätzen zu entfernen, wurden gleiche Volumina jeder Fraktion mit Ethanol und je 20 µg tRNA als Träger-Substanz präzipitiert. Die Sedimente wurden gründlich in 70% Ethanol gewaschen und in einem geeignetem Volumen TE aufgenommen. Jeweils gleiche Portionen der so präzipitierten DNA wurden in einem Perkin Elmer PE 460 *thermal cycler* in einer PCR eingesetzt. Dabei wurden folgende Bedingungen programmiert: 94°C 5' 1x; 94°C 1', 68°C 45'', 72°C 40'', 10x; 94°C 1', 62°C 45'', 72°C 40'' 10x-20x.

Nach Abschluß der PCR wurden gleiche Anteile der Amplicons auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Ende der Elektrophorese wurde die DNA durch Southern Blotting auf eine positiv geladene Nylonmembran aufgebracht. Die Protokolle für DNA-DNA Hybridisierung und Autoradiographie sind unten weiter ausgeführt. Die Signalintensität wurde mit einem Fuji X-BAS 1000 Phosphoimager ausgewertet.

5.7 Midipräparation von Plasmid-DNA

Für Plasmid-DNA-Midipräparationen wurde der Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Präparation folgte dabei im wesentlichen den Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der selektiven alkalischen Denaturierung der hochmolekularen chromosomalen DNA, während kovalent geschlossene zirkuläre (Plasmid)-DNA weiterhin doppelsträngig bleibt (Birnboim and Doly, 1979). Nach Neutralisierung der Lösung bleibt die chromosomale DNA weitgehend denaturiert und bildet ein unlösliches Aggregat, während die Plasmid-DNA im Überstand bleibt. Durch anschließende Zentrifugation konnte so die Plasmid-DNA leicht von der chromosomalen DNA getrennt werden. Die Plasmid-

DNA im Überstand wurde über eine Säule mit Anionenaustauscher-Matrix gereinigt und mit Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen TE aufgenommen.

5.8 Präparation von Plasmid-DNA (Minipräparation) durch Kochlyse

(Holmes und Quigley, 1981)

Von einer Platte einer frisch ausgestrichenen Bakterienkultur wurde eine Kolonie gepickt und eine Übernachtskultur angeimpft. Am folgenden Tag wurden davon 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec bei Raumtemperatur in einer Laborzentrifuge bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 420 µl STET-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl einer Lysozymlösung und kurzem Durchmischen wurde das Reaktionsgefäß für 90 sec in einem Wasserbad auf 100°C erhitzt.

Daraufhin wurde für 10 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 40 µl 2,5 M Natriumacetat und 420 µl Isopropanol gefällt und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Mitausgefallenes Natriumacetat wurde durch einmaliges Waschen mit 70% Ethanol entfernt.

Das Sediment wurde unter Vakuum getrocknet und in 30 µl TE resuspendiert.

5.9 Sequenzieren von Plasmid-DNA

5.9.1 Vorbereitung der DNA zum Sequenzieren

Sollte Plasmid-DNA aus einer Minipräparation sequenziert werden, so wurde zunächst die Qualität der Präparation auf einem Agarosegel geprüft. War sie zufriedenstellend, wurden 15-20 µl der Plasmid-DNA mit 1 µl RNase A versetzt und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA zum Sequenzieren denaturiert. Dazu wurde sie 15 min mit 1/10 Volumen 3 M NaOH inkubiert, um direkt anschließend mit Ethanol gefällt zu werden. Statt Natriumacetat wurde hier Ammoniumacetat eingesetzt; dabei wurde 1 Volumen 6M Ammoniumacetat und das vierfache Volumen an absolutem Ethanol zugesetzt, gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Anderntags wurde die gefällte DNA in einer Laborzentrifuge sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das Sediment wurde in 10 µl H₂O aufgenommen.

5.9.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden von Birgit Schmitz durchgeführt. Dazu wurde der DNA-Sequenzierer 377 von Perkin Elmer eingesetzt. In den Sequenzreaktionen wurden je etwa 1µg der zuvor - wie oben beschrieben (3.7.1) - behandelten Plasmid-DNA und etwa 50 ng Primer eingesetzt.

Die Reaktion wurde dann unter Verwendung des „ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“ Kits entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.10 Computerunterstützte DNA-Sequenzanalyse

Nukleotidsequenzanalysen wurden mit dem GCG-Programm-Paket (University of Wisconsin Genetics Computer Group, Version 9.0) durchgeführt (Devereux, 1984). Dabei wurden vor allem die Programme SEQED, FINDPATTERNS, REPEAT, STEMLOOP und FASTA benutzt. Für Sequenzvergleiche mit Sequenzen aus Datenbanken wurde außerdem BLAST verwendet.

5.11 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen und elektrophoretische Trennung der Fragmente in Agarose- oder Polyacrylamidgelen

siehe Diplomarbeit Gerd Wronka, 1997

5.12 Transfer von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf positiv geladene Nylonmembranen („Southern-Blotting“) (Southern, 1975; Koetsier et al., 1993)

siehe Diplomarbeit Gerd Wronka, 1997

5.13 Radioaktive Markierung der DNA nach der „Oligo-Labeling“-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983, 1984)

siehe Diplomarbeit Gerd Wronka, 1997

5.14 Hybridisierung von radioaktiv markierter DNA an filtergebundene DNA

(Wahl et al., 1979)

Die filtergebundene einzelsträngige DNA konnte durch Hybridisierung mit homologer radioaktiv markierter DNA charakterisiert werden. Nachdem die Nylonmembran bei 80°C inkubiert wurde, um die DNA irreversibel zu binden, wurde die Membran zunächst präinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dazu wurde sie in Hybridisierungsröhren mit 10-30 ml Prä-Hybridisierungslösung 2-4 h lang bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und die Membran wurde in 10-30 ml Hybridisierungslösung zusammen mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde 12-18 h inkubiert. Prä-Hybridisierungs- und Hybridisierungslösung wurden vor Gebrauch 10 min gekocht und dann im Eis-Wasserbad abgekühlt. Um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, wurde die Membran nach der Inkubation mit der radioaktiv markierten DNA dreimal 15-20 min in 2 x SSC/0,1 % SDS (Waschlösung I) sowie dreimal 30-45 min lang in 0,1 x SSC/0,1% SDS (Waschlösung II) bei 68°C gewaschen. Danach wurde die Nylonmembran in Röntgenfilmkassetten bei -80°C auf Kodak XAR 5-Röntgenfilmen exponiert.

Nylonmembranen wurden zur mehrmaligen Hybridisierung verwendet, so daß derselbe Filter mit verschiedenen radioaktiv markierten DNA-Proben nacheinander hybridisiert werden konnte. Die Filter wurden zwischen den Inkubationen mit verschiedenen Hybridisierungssonden in 0,1 x SSC/0,1%SDS 30 min gekocht, um spezifisch gebundene DNA wieder zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen entweder gleich erneut hybridisiert oder bei -20°C gelagert.

5.15 Elution und Reinigung elektrophoretisch getrennter DNA-Fragmente aus Agarosegelen (mit der „Biotrap“-Elutionskammer)

siehe Diplomarbeit Gerd Wronka, 1997

5.16 Präparation kompetenter Zellen

(Indrikis Muiznieks, persönliche Mitteilung)

Bakterien kompetent zu machen, bedeutet, sie in die Lage zu versetzen, effizient DNA aufzunehmen. Ausgehend von Mandel und Higa (1970) wurden viele Parameter bestimmt, die diesen Prozess positiv beeinflussen. Im einzelnen wurden hier die Bakterienkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und die

Zellen während sämtlicher Arbeitsschritte auf Eis gehalten. Außerdem wurde die CaCl_2 -Exposition verlängert (Dagert und Ehrlich, 1974) und der positive Einfluß von Mn^{2+} -Ionen genutzt.

Ein Tropfen eines geeigneten Bakterienstammes wurde auf einer Agarplatte ohne Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser frischen Platte wurde am nächsten Tag eine Einzelkolonie gepickt mit der 2 ml 2 x TY-Medium angeimpft wurden. Die Hälfte dieser Übernachtskultur wurde anderntags in 50 ml vorgewärmtes 2 x TY-Medium übertragen und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Das Wachstum dieser Kultur wurde bis in die Logphase photometrisch kontrolliert. War der Stamm recA^+ , wurde bei einer $\text{OD}_{600} = 0,2-0,3$ 1 ml 1 M MgCl_2 hinzugegeben, bei einem recA^- - Stamm erst bei einer OD_{600} von 0,5. Nach weiteren 30 - 40 min, als eine $\text{OD}_{600} = 0,7-0,8$ (recA^+) bzw. eine $\text{OD}_{600} = 1,0-1,2$ (recA^-) erreicht war, wurde die Kultur in ein Eis-Wasserbad überführt. Nach einer Stunde wurden die Zellen für 10 min bei 4000 UpM (Labofuge GL) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 20 ml eiskalter CMN-Lösung resuspendiert. Diese Suspension wurde nun für mindestens vier Stunden, für eine verbesserte Transformationseffizienz aber meist über Nacht auf Eis inkubiert. Nachdem die Zellen anschließend erneut für 10 min bei 4°C und 4000 UpM zentrifugiert worden waren, wurde das Sediment in 4 ml CMN-Lösung resuspendiert.

Diese Zellsuspension wurde mit 1/6 Volumen eiskaltem Glycerin vermischt und aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. So blieb die Transformationseffizienz über mehrere Monate erhalten. Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, wurden mit mehreren Aliquots Testtransformationen durchgeführt. Eingesetzt wurden kompetente Zellen mit einer Transformationseffizienz von $0,5 - 1,5 \times 10^8 / \mu\text{g DNA}$.

5.17 Transformation

5.17.1 Transformation des Bakterienstammes HB101/LM1035

Um die Transformationseffizienz nicht zu mindern, wurden die ersten Schritte der Transformation alle auf Eis und in gekühlten Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen wurden aufgetaut; 140 μl dieser Zellsuspension wurden mit der in 10 μl TE aufgenommenen Plasmid-DNA und 1 μl 0,5 M Natriumacetat (pH 5,0) versetzt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde dieser Ansatz in 0,5 ml vorgewärmtes 2 x TY-Medium (mit 2 µl 1 M MgCl₂) überführt und für maximal 50 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) 2 x TY-Agarplatten, auf die ungeladene Nylonmembranfilter gelegt worden waren, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.17.2 Transformation des „Epicurian Sure⁰ 2 Supercompetent“-Bakterienstammes

siehe Diplomarbeit Gerd Wronka, 1997

5.18 Lagerung von Bakterienstämmen in Glycerinkulturen

Um Bakterienkulturen für längere Zeit aufzubewahren wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 1 ml einer frisch saturierten Bakterienkultur mit 1 ml Glycerinlösung (65% (v/v) Glycerin, 0,1 M MgSO₄, 0,025 mM Tris pH 8,0) vermischt und bei -20°C oder -80°C aufbewahrt.

5.19 Untersuchung transformierter Bakterienkolonien auf rekombinante DNA - Koloniehybridisierung

(Grunstein und Hogness, 1975)

Die positiven Rekombinanten der *in vitro* Rekombinationsreaktion wurden durch das Verfahren der Koloniehybridisierung identifiziert. Dabei kann eine große Zahl von Bakterienkolonien auf Fremd-DNA untersucht werden. Da die transformierten Plasmide ein Resistenzgen enthielten, war durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in das Agarplattenmedium ein erster Selektionsschritt gegeben. Um die positiven Rekombinanten zu isolieren, wurden die Bakterienzellen lysiert, die Plasmid-DNA auf der Nylonmembran fixiert und mit der entsprechenden [³²P] - markierten DNA-Sonde hybridisiert.

Um später dem Signal eine bestimmte Kolonie zuzuordnen, wurde zunächst ein Abzug vom Referenzfilter angefertigt. Dazu wurde ein zweiter ungeladener Nylonmembranfilter auf den Referenzfilter gelegt und vorsichtig mit einer Pipette angedrückt. Zur Orientierung wurden mit einer sterilen Klinge asymmetrische

Markierungen angebracht. Der Replikafilter wurde auf eine frische antibiotikahaltige Agarplatte gelegt und nach dem Anwachsen der Kolonien bei 4°C gelagert.

Der Referenzfilter wurde nun in der Koloniehybridisierung eingesetzt. Dazu wurden mehrere Schalen mit „Whatman“-Filterpapier ausgelegt, das mit den jeweiligen Lösungen getränkt worden war. Im ersten Schritt wurden die Filter für 7 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl/ 0,5 M NaOH) inkubiert, so daß die Zellen aufbrachen und gleichzeitig die DNA denaturiert wurde. Anschließend wurden sie 3 min in 1,5 M NaCl/ 0,5 M Tris-HCl (pH 8) (Neutralisierungslösung) und 30 sec in 2 x SSC/ 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5) (Waschlösung A) gelegt. Die Filter wurden auf „Whatman“-Filterpapier kurz getrocknet und zur Fixierung für 20-30 min in 0,4 M NaOH gelegt. Abschließend wurden die Filter kurz in 5 x SSC (Waschlösung B) geschwenkt und für eine Stunde bei 80°C gebacken.

Später wurden die Filter zusammen mit einer Zwischenmembran in eine Hybridisierungsröhre eingerollt und über Nacht präinkubiert. Nach der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde konnten die positiven Klone mittels des entwickelten Röntgenfilms auf den Replikafiltern identifiziert werden.

5.20 Überprüfung des *recA*-Genotyps

siehe Diplomarbeit Gerd Wronka, 1997

5.21 Die *in vitro* Rekombinationsreaktion und der Nachweis der *in vitro* Rekombinanten

(Jessberger et al. 1989)

5.21.1 Die Standardbedingungen

Partner der *in vitro* Rekombinationsreaktion waren das linearisierte Plasmid p7pBR322 und das PstI-D-Fragment des Ad12-Genoms. Zur Rekombinationsreaktion wurde dieses Fragment aus dem Plasmid pBR322-pstD ausgeschnitten, welches ebenso wie das pBR322-p7-Plasmid zweimal über einen Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigt worden war. Nach dem Ausschneiden des PstI D-Fragmentes aus dem Vektor wurde es zweimal über ein Agarosegel gereinigt; anschließend wurde die DNA mit Hilfe der „Biotrap“-Kammer aus dem Gel eluiert, gefällt und in einem geeigneten Volumen TE aufgenommen.

Das Plasmid mit der Präinsertionssequenz p7 (Jessberger et al., 1989) wurde stets linearisiert in der Reaktion eingesetzt. Dazu wurde es mit der

Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten, gefällt und wiederum in TE aufgenommen. Für die Rekombinationsreaktion wurde jeweils nur frisch präpariertes PstI D-Fragment und frisch geschnittenes p7-pBR322 eingesetzt.

Jedem Ansatz wurde neben der zu testenden Proteinfraktion 200 ng (\cong 50 fmol) linearisierte p7-pBR322- und 500 ng (\cong 250 fmol) PstI-D-DNA zugefügt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 50 μ l. Neben Protein und DNA enthielt er außerdem folgende Substanzen (Endkonzentrationen): 1 mM ATP, 5 mM Creatinphosphat, 1 mM DTT, 0,1-0,2 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM HEPES, 15 mM MgCl₂, 75 mM NaCl, 0,15 mM jedes dNTPs, 0,5 mM PMSF, 10-15 mM Tris-HCl (pH 7,6) und 1 mM ZnCl₂.

Die Ansätze wurden zusammengegeben, vorsichtig gemischt und bei 37°C oder 24°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach 30 min wurden 4 μ l 10% (w/v) SDS und 2 μ l Proteinase K (10 μ g/ μ l) zugegeben, nach weiteren 45 min bei 37°C wurden die Ansätze schließlich herausgeholt und jeweils mit TE auf 100 μ l aufgefüllt.

Die Proben wurden nun jeweils mit dem doppelten Volumen Phenol:Chloroform (1:1) versetzt. Da nur sehr kleine DNA-Mengen eingesetzt worden waren, wurde die gewonnene organische Phase noch einmal mit je 100 μ l Tris-HCl pH 7,8 reextrahiert. Beide wässrigen Phasen wurden vereint und einmal mit dem doppelten Volumen Chloroform extrahiert. Die Oberphase wurde abgenommen und die darin enthaltene DNA mit Ethanol gefällt. Das Sediment wurde in 5 μ l bzw. in 10 μ l TE aufgenommen und in der Transformation eingesetzt.

5.21.2 Identifizierung der Rekombinationsprodukte durch den E.coli Transfektionsassay

Nach Resuspension in 10 μ l TE wurden kompetente Bakterien des Stammes HB101/LM1035 (recA⁻) mit der rekombinanten DNA transfiziert. Bei Verwendung des rekombinations-defizienten Stammes „Epicurian Sure[®]2 Supercompetent“ wurde der Rekombinationsansatz in 5 μ l TE resuspendiert. Die transformierten Bakterien wurden auf ampicillinhaltigen (75-100 μ g/ml) Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die ampicillinresistenten Kolonien wurden durch Koloniehybridisierung nach Grunstein und Hogness (1975) auf das Vorhandensein von Ad12-DNA in den Plasmiden überprüft. Die filtergebundene DNA wurde dazu mit [³²P] - markierter Ad12-DNA hybridisiert. Nach der Autoradiographie konnten die Ad12-positiven Bakterienkolonien von der Replikaplatte isoliert werden. War die Koloniedichte nicht zu hoch, konnten die in Frage kommenden Kolonien direkt gepickt werden. Ansonsten wurde der Bereich um das Signal auf dem Replikafilter mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in 5 ml ampicillinhaltiges (75-100 μ g/ml) LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Von dieser saturierten Übernachtskultur wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Die Verdünnungen $1:10^5$ und $1:10^6$ wurden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Filter wurden einer neuen Koloniehybridisierung unterzogen, um einzelne Kolonien zu isolieren. Nach einer Plasmid-Mini-Präparation mit anschließender Restriktionsanalyse wurden die so isolierten *in vitro* Rekombinanten in einem ersten Schritt analysiert. In den gefundenen Rekombinanten wurde die Verbindungsstelle zwischen viralem Fragment und dem pBR322-p7-Plasmid sequenziert.

5.21.3 Nachweis der Rekombinationsprodukte durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Neben dem E.coli-Transfektionssystem konnten die Rekombinationsprodukte auch mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Saiki et al., 1988) amplifiziert und nachgewiesen werden. Wurde dieses Nachweissystem verwendet, wurde die DNA nach der Phenol/Chloroformbehandlung in $20\mu\text{l}$ TE aufgenommen, ein Zehntel dieses Volumens wurde anschließend in der PCR eingesetzt. So waren in jedem Ansatz der PCR-Reaktion etwa 20 ng pBR322-p7 und etwa 50 ng PstI-D-Fragment mitenthalten; die weiteren Komponenten pro Ansatz waren: je 0,5 mM je DNA Primer, 1 – 3 mM MgCl_2 (Promega), je 0,2 mM je dNTP (Promega), 0,1 % Triton X-100 und 2,5 Einheiten der *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA Polymerase I (Promega). Die Zyklusparameter der Amplifikationsreaktionen waren für die ersten 10 Zyklen mit erhöhter Stringenz: 1 min bei 94°C zur Denaturierung, 2 min bei 68°C für die Hybridisierung der Primer an die DNA und 2 min bei 72°C für die Polymerisationsreaktion. Dieser ersten Zyklusphase folgten 25 Zyklen mit niedrigerer Stringenz, in denen die Hybridisierungstemperatur auf 60°C oder 62°C herabgesetzt wurde und ein abschließender *extension file* (2 min bei 72°C). Nach Überschichtung der Reaktionsansätze mit Mineralöl (Sigma) wurde die Amplifikation im DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe eines Gelextaktionskits (Qiagen) gereinigt. Anschließend wurden die gereinigten Produkte im Bereich der Verknüpfungsstelle sequenziert.

5.22 Präparation und Reinigung von Zellkernextrakten

5.22.1 Präparation von Kernextrakten aus uninfizierten BHK21-Zellen

(Shapiro et al., 1988)

Ausgangsmaterial für die Kernpräparationen waren BHK21 (C13) - Zellen, die von der GBF (Gesellschaft für biotechnologische Forschung mbH) bezogen worden waren und aliquotiert bei -80°C gelagert wurden.

Je Präparation wurde eine Portion von ca. 5×10^9 Zellen verwendet. Die Kerne wurden durch Aufbrechen der Zellmembranen in Homogenisatoren gewonnen, anschließend wurden die Kernproteine durch einen Hochsalzpuffer herausgelöst.

Zunächst wurden die Zellen bei RT, anschließend auf Eis aufgetaut und alle benötigten Puffer und Materialien auf Eis vorgekühlt. Alle folgenden Arbeiten fanden im Kaltraum bei 4°C statt.

Nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurden sie mit einer 10 ml Pipette auf vier 50 ml Gefäße verteilt und zweimal mit PBS-d gewaschen. Dazu wurde das Gefäß jeweils mit PBS-d aufgefüllt, die Zellen wurden resuspendiert und bei 1800 UpM (Heraeus Labofuge GL) für 10 min zentrifugiert. Jedes Zellsediment (3-4 ml „pcv“) wurde nun in 10 ml hypotonischem Puffer A resuspendiert, anschließend wurde jeweils auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Um die Zellen anschwellen zu lassen, wurden sie nun für 20-60 min auf Eis inkubiert. Dabei vergrößerte sich das „packed cell volume“ nur unmerklich. Danach wurden sie unter den oben genannten Bedingungen erneut abzentrifugiert und in jeweils 15 ml Puffer A aufgenommen. Zum „Douncen“ wurden je zwei Ansätze vereint.

Um die Cytoplasmamembran aufzubrechen, wurden die Zellen in einen Homogenisator mit eng anliegendem Kolben („S“) überführt. Die BHK21 - Zellen wurden nun mit 35-40 Stößen lysiert. Der Fortschritt der Lyse wurde dabei fortlaufend lichtmikroskopisch kontrolliert. Nach den ersten 35-40 Stößen wurde 1/10 Volumen des Saccharose-Salz-Puffers (Puffer B) zugegeben und mit der Homogenisierung wurde in Homogenisatoren mit weitem Kolben („L“) fortgeföhren. Zur weiteren Verarbeitung mußten die Zellen zu etwa 90% aufgeschlossen sein. Um die freigesetzten Zellkerne vom Zelldebris zu trennen, wurde die Suspension nun in zwei 30 ml-Corex-Röhrrhen überführt und für 30 sec bei ca. 12000 UpM (JA-20-Rotor, Beckman J2-21) zentrifugiert. Der trübe cytoplasmatische Überstand wurde verworfen und das Zellkernsediment in 3 ml Puffer C pro 1×10^9 Zellen resuspendiert. Diese Suspension wurde 30 min unter ständigem Schütteln bei 4°C inkubiert. Durch die hohe Salzkonzentration (0,42 M Ammoniumsulfat) wurden die Proteine aus dem Kern herausgelöst und diffundierten in den Extraktionspuffer. Im Anschluß wurde diese Suspension in SW-41-Polyallomerröhrrhen (Beckman)

übertragen und für 90 min bei 30.000 UpM bei 2°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und direkt anschließend für drei Stunden gegen insgesamt 6 l Puffer D im Eis-Wasserbad dialysiert. Die benutzte Dialysemembran hatte ein Ausschlußvolumen von 12.000-14.000 Da und war zuvor durch zwanzigminütiges Kochen in dest. H₂O sterilisiert worden.

Der dialysierte Proteinrohextrakt wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.22.2 Fraktionierung der Kernextrakte aus BHK21-Zellen

Um die Rekombinationsaktivität genauer zu charakterisieren, wurden die Kernextrakte über mehrere chromatographische Schritte fraktioniert. Dazu wurde das FPLC-System der Firma Amersham Pharmacia eingesetzt.

Sephacryl S-300 HR (Fraktion II) - Der dialysierte Kernextrakt wurde zunächst in einer Eppendorffzentrifuge für 10 min bei 4°C und 13.000 UpM zentrifugiert, um möglicherweise vorhandene größere Partikel zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und auf eine mit dem Standardpuffer (20 mM HEPES, pH 7,9, 20% Glycerin, 150 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) equilibrierte Sephacryl S-300 HR- Gelfiltrationssäule (Pharmacia XK 26/60) gegeben.

Die rekombinationsaktiven Proteinfractionen eluierten mit dem Standardpuffer bei einer Flußrate von 0,5 ml/min im Neben-“peak“ des Absorptionsprofils bei A=280 nm von der Säule und wurden als Fraktion II bezeichnet.

Resource S (Fraktion III) - Die in Fraktion II gepoolten Proteine wurden nun auf eine 5 ml Resource S Kationenaustauschersäule (Pharmacia, HR5/5) geladen, die zuvor mit dem Standardpuffer equilibriert worden war. Die aktiven Fraktionen lagen hier im Durchfluß und wurden zusammen als Fraktion III gesammelt.

Resource Q (Fraktion IV) - Eine 5 ml Resource Q Anionenaustauschersäule (Pharmacia, HR5/5) wurde mit Standardpuffer equilibriert, mit Fraktion III beladen und dann mit dem zweifachen Säulenvolumen Standardpuffer gewaschen. Im Stufengradienten eluierte die Rekombinationsaktivität erst bei einer Salzkonzentration von 500 mM NaCl im Standardpuffer von der Säule. Diese Fraktionen wurden erneut vereint und Fraktion IV genannt.

Zur weiteren Verwendung wurde diese Fraktion gegen mindestens 3,5 l Standardpuffer für 3h im Eis-Wasserbad dialysiert, wobei der Dialysepuffer mehrfach gewechselt wurde.

Heparin-Sepharose (Fraktion V) - Die dialysierte Fraktion IV wurde auf eine zuvor mit Standardpuffer equilibrierte Heparin-Sepharose Säule (HiTrap 5 ml, Amersham Pharmacia) aufgetragen. Die rekombinationsaktiven Proteine eluierten im Durchfluß als Fraktion V.

Alle Säulen wurden bei 4°C betrieben. Wurde das Reinigungsschema an einer Stelle unterbrochen, wurde die jeweils gereinigte Fraktion in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. So war die Rekombinationsaktivität über mehrere Monate stabil.

5.23 Proteinkonzentrationsbestimmung

(Bradford, 1976)

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bindet unter Bildung eines Chromophors an Proteine. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 465$ nm auf $\lambda = 595$ nm.

Darauf beruhend vergleicht die Methode nach Bradford die Bindung des Farbstoffes an Proteine einer Lösung unbekannter Konzentration mit der Bindung an unterschiedliche Mengen eines Standardproteins (BSA). Das Verfahren besitzt den Nachteil, daß die Extinktionsänderungen bei verschiedenen reinen Proteinen unterschiedlich sein können, bei Rohhomogenaten gleichen sich diese Differenzen allerdings aus.

Zur Eichung wurde eine Eichgerade aus zwei unabhängigen Meßreihen erstellt. Für jede Meßreihe wurde eine Verdünnungsreihe aus einer exakt eingestellten Standardlösung von Rinderserumalbumin (Pierce) erstellt. Bei der späteren Auswertung wurden nur Konzentrationen, die im linearen Bereich der Eichgerade lagen, berücksichtigt.

Um die Proteinkonzentrationen der Kernextrakte bzw. der gereinigten Proteinfractionen zu bestimmen, wurden in Plastikkuvetten je nach Konzentration der zu messenden Fraktion unterschiedliche Mengen der Proteinlösungen mit 0,15 M Natriumchloridlösung auf 100 µl eingestellt und dann mit 1,9 ml des Bradford-Reagenzes versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben nach mindestens zweiminütiger Inkubation bei RT gegen den Referenzwert (100 µl 0,15 M Natriumchloridlösung in 1,9 ml Bradford-Reagenz) bei 595 nm gemessen.

5.24 Diskontinuierliche SDS/Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein amphiphiles Detergens, das in der Lage ist, die native Struktur der Proteine aufzufalten. Etwa ein SDS-Molekül pro 3 Peptidreste wird gebunden, und die Proteine nehmen wegen der sich gegenseitig abstoßenden Ladungen eine langgestreckte, stäbchenförmige Struktur an. Man erhält so ein stark negativ geladenes Aggregat, bei dem der Anteil der durch das Protein auftretenden Ladungen gegenüber der des SDS keine Rolle mehr spielt und das so ein konstantes Gewichts/Ladungs-Verhältnis besitzt. Die Trennung durch den Molekularsieb - Effekt des Acrylamidgels erfolgt also ausschließlich nach der Größe des Proteins.

Außer dem Molekulargewicht bestimmt die Porengröße des Gels, die von der Acrylamidkonzentration sowie der Konzentration des Vernetzungsreagenzes N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS) abhängt, die Länge der Wanderungsstrecke eines Proteins im Gel. Die radikalisch verlaufende Polymerisation wird durch ein Initiatorredoxsystem aus APS und TEMED gestartet.

Bei der speziellen Form der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese bewirken Diskontinuitäten der Porengröße und der beteiligten Puffersysteme, daß die Proteine in einer schmalen Zone gesammelt werden und im Trenngel als scharfe Bande starten.

5.24.1 SDS/Polyacrylamidgele

Lösungen für die Herstellung von SDS/Polyacrylamidgelen:

Endkonz. Acrylamid	40% PAA Stammlösung	4 x Tris/SDS-Puffer pH 8,8	H ₂ O	APS	TEMED
-----------------------	------------------------	-------------------------------	------------------	-----	-------

1. Trenngel :

(1mm)

10%	6,25 ml	6,25 ml	12,5 ml	0,6 ml	0,03 ml
-----	---------	---------	---------	--------	---------

2. Sammelgel :

(1mm)

4%	1,10 ml	2,50 ml	6,40 ml	0,2 ml	0,01 ml
----	---------	---------	---------	--------	---------

Die so vorbereitete Polyacrylamidlösung des Trenngels wurde nun zwischen zwei sorgfältig gereinigte Glasplatten gefüllt, die in der entsprechenden Vorrichtung eingespannt und mit Parafilm abgedichtet waren. Um einen geraden Abschluß des Trenngels zu erhalten, wurde das noch nicht polymerisierte Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde dies entfernt und sorgfältig nachgespült. Anschließend wurde das Trenngel mit der Polyacrylamidlösung des Sammelgels überschichtet und ein geeigneter Kamm zwischen die Glasplatten geschoben.

Nach vollständiger Polymerisation über Nacht bei 4°C wurde der Kamm vorsichtig entfernt, die Geltaschen sorgfältig mit Elektrophoresepuffer gespült und das Gel in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Proteingelkammer eingesetzt. Die Proben wurden in Probenpuffer (Laemmli, 1970) gelöst, 10 - 15 min bei 100°C denaturiert und in die Geltaschen des Sammelgels gegeben. Die Elektrophorese wurde entsprechend den Bedingungen der jeweiligen Kammer durchgeführt. Der im Probenpuffer als Referenz dienende Farbstoff Bromphenolblau wanderte vor der Lauffront und zeigte so das Ende der Elektrophorese an. Nach Beenden der Elektrophorese wurden die Proteine durch unterschiedliche Färbemethoden im Gel sichtbar gemacht; durch mitgelaufene Proteinstandardmarker konnte ihre Größe abgeschätzt werden.

5.24.2 Färbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue R-250

Der Nachweis der Proteinbanden im Gel bei dieser Färbung beruht auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue R-250 an Proteine. Da er nicht an das Polyacrylamidgel bindet, erscheinen die Proteine als blaue Banden umgeben von klaren Gelzonen. Die Nachweisgrenze liegt etwa bei 0,3 - 1,0 µg/Proteinbande. Fixierung und Färbung erfolgten simultan im ersten Schritt des angewandten Protokolls. Dazu wurde das Gel zunächst vorsichtig von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgetrennt. Nun wurde das Trenngel in die Färbe- und Fixierlösung (45% Methanol, 7% Essigsäure, 0,2%-0,5% Coomassie Brilliant Blue R-250) gelegt. Unter ständigem Schwenken wurde es dort - je nach Gehalt an Coomassie Brilliant Blue - für 2-16 h inkubiert. Zur Reduzierung der Hintergrundfärbung und zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff wurde das Gel anschließend in einer wäßrigen Lösung aus 5% Methanol und 7% Essigsäure entfärbt, wobei die Entfärbezeit von der Konzentration der Färbelösung und der Färbezeit abhängig war.

Das so gefärbte Polyacrylamidgel wurde nun zur Stabilisierung 3-4 h in 15% Glycerin inkubiert, photographiert und anschließend zwischen zwei angefeuchteten Cellophanfolien bei 65°C im Geltrockner eingeschweißt.

Das so präparierte Gel konnte bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

5.24.3 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

(Switzer et al., 1979; Ansorge, 1983)

Der Nachweis von Proteinbanden in einem Polyacrylamidgel durch Silberfärbung beruht auf der Bindung von Silber an verschiedene chemische Gruppen - z.B. an Sulfhydryl- und Carboxylgruppen der Proteine. Die Silberfärbung ist mehr als hundertfach sensitiver als die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250, so daß schon etwa 2-5 ng/Proteinbande nachgewiesen werden können. Allerdings werden nicht alle Proteine gleich stark oder sogar überhaupt nicht gefärbt. Durch Behandlung des Gels mit Kaliumpermanganat und CuCl_2 können diese Banden unter Umständen sichtbar gemacht werden.

Das Trenngel wurde über Nacht in 12% Trichloressigsäure (TCA) und 50% Methanol fixiert. Bei allen Inkubationen wurde die Färbewanne auf einem Schüttler leicht geschwenkt, so daß alle Färbelösungen gut zirkulieren konnten. Anderntags wurde das Gel in eine CuCl_2 -Lösung überführt und darin für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde es kurz mit dest. Wasser gespült und zweimal 15 min lang in 5% Essigsäure/ 10% Ethanol geschwenkt. Anschließend wurde es für weitere 30 min in einer 1% Kaliumpermanganatlösung inkubiert und erneut zweimal 15 min lang mit 5% Essigsäure/ 10% Ethanol behandelt.

Nun wurde es zunächst 15 min in dest. Wasser geschwenkt, bevor es für 20 min in einer 0,01%igen AgNO_3 -Lösung inkubiert wurde. Nach kurzem Waschen (ca. 45 sec) mit dest. Wasser wurde das Gel in die frisch angesetzte Entwicklerlösung gelegt. Diese Lösung wurde nach 60 sec ausgetauscht und die Reaktion nach Sichtbarwerden der Proteinbanden mit 50 mM EDTA-Lösung abgestoppt.

Das Gel wurde für einige Stunden in 15% Glycerin aufbewahrt, photographiert und - wie oben geschildert - getrocknet.

5.25 Transfer von Proteinen auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membranen und Detektion mit spezifischen Antikörpern (*Western-Blotting*)

5.25.1 Proteintransfer auf PVDF-Membranen im „Nassblot“-Verfahren

Nach Abschluß der SDS-PAGE wurde das Polyacrylamidgel 10 min in Blotpuffer geschwenkt, um überschüssiges SDS aus dem Gel zu entfernen. Die Proteine wurden in einer Transferkammer (BioRad) auf die PVDF - Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zunächst für 5 sec in Methanol, 5 min in H₂O und etwa 10 min in Blotpuffer inkubiert. Die Transferkissen wurden mit Blotpuffer gesättigt und alle Luftblasen entfernt. Die Transfereinheit bestand aus Gel und PVDF-Membran zwischen je einer Lage „Whatman“-papier und Transferkissen, wobei das Gel in Richtung Kathode, die Membran Richtung Anode wies.

Die Kammer wurde mit Blotpuffer aufgefüllt und der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 15 V und 4°C.

5.25.2 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Die Membran wurde bei allen Schritten dieses Protokolls in der angegebenen Lösung auf einem Schüttler leicht geschwenkt.

Nach Abschluß des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran sofort in Blockpuffer 1 gelegt und zur Absättigung entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden anschließend in Blockpuffer 1 individuell verdünnt auf die Membran gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die ungebundenen Immunglobuline entfernt, indem die Membran dreimal für je 15 min mit TBS-T gewaschen wurde. Die zweite Antikörperreaktion erfolgte ebenfalls 1 h lang bei Raumtemperatur in Blockpuffer 1, in dem die jeweiligen sekundären Antikörper (Peroxidase-gebundener Antikörper) verdünnt vorlagen. Nach erneutem intensiven Waschen (s.o.) wurden die Detektionslösungen des ECLTM-Detektionskits (Amersham Pharmacia) im angegebenen Volumenverhältnis zusammengemischt und anschließend auf die auf einer Folie ausgebreiteten Membran gegeben. Nach kurzer Inkubationszeit wurde die Membran auf Filterpapier getrocknet und dann ganz in Folie eingepackt und in einer Filmkassette auf einem Röntgenfilm 1-30 min exponiert.

5.26 Konzentrierung von Proteinen

siehe Diplomarbeit Gerd Wronka, 1997

5.27 Zonensedimentation von Proteinsuspensionen - Glycerolgradient

Neben chromatographischen Methoden bietet sich auch die Zentrifugation im Dichtegradienten zur Auftrennung von Proteinsuspensionen an. Dazu wurde hier ein 10%-30%-Glycerin-Dichtegradient gewählt; von Glycerin wird angenommen, daß es Proteine vor Denaturierung schützt.

Da der Standardpuffer, in dem die Proteine nach der Kernextraktion und während der chromatographischen Reinigung aufgenommen worden waren, 20% Glycerin enthielt, wurden die Proben zunächst gegen einen 10%igen Standardpuffer dialysiert. Dies geschah in einem Mikrodialysiersystem an vorgefertigten Membranen mit einem Ausschlußvolumen von 6000-8000 Da (Bethesda Research). Dieses System besteht aus einzelnen Kammern, deren Boden durch die Dialysemembran gebildet wird. Unterhalb der Membran - angetrieben von einer peristaltischen Pumpe - strömt der Dialysepuffer. So bietet dieses System den Vorteil, daß kleinste Mengen an Lösungen ohne nennenswerte Verluste in relativ kurzer Zeit dialysiert werden können.

Insgesamt wurden 500-750 µl Proteinlösung - aufgeteilt auf mehrere Kammern - eingesetzt und 2h gegen zwei Liter eisgekühlten Standardpuffer mit 10% Glycerin dialysiert. Dann wurde die Lösung abgezogen und auf den in der Zwischenzeit gegossenen Glycerolgradienten aufgetragen.

Der Gradient wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers in einem SW41 (Polyallomer) Zentrifugenröhrchen aufgebaut. Dazu wurden insgesamt 5,5 ml 30%iger und 5,5 ml 10%iger vorgekühlter Standardpuffer eingesetzt. Dann wurde der fertige Gradient vorsichtig mit 550 µl dialysierter Proteinlösung überschichtet, mit 10%igem Puffer tariert und in den Rotor eingesetzt.

Anschließend wurde bei 35.000 UpM und 2°C für 20-60h zentrifugiert. Das Auslaufen erfolgte ohne Bremse. Das Zentrifugenröhrchen wurde entnommen und zum Austropfen in eine spezielle Vorrichtung gespannt. Dabei konnte nach Anstechen des Röhrchens die Luftzufuhr reguliert werden, so daß die Austropfgeschwindigkeit kontrolliert werden konnte.

Aufgefangen wurden etwa 30-35 Fraktionen mit jeweils etwa 350 µl. Sie wurden entweder direkt im *in vitro* Rekombinationsassay eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Fraktionierung der

Proteinlösungen wurde durch das Auftragen von Aliquots einzelner Fraktionen auf Polyacrylamidgele und anschließende Färbung kontrolliert.

6. Zusammenfassung

In vorangegangenen Arbeiten ist ein zellfreies System zur Untersuchung der Rekombination zwischen adenoviraler und Säuger-DNA etabliert worden (Jessberger et al., 1989; Tatzelt et al., 1992, 1993). In dem zellfreien System wurde das PstI-D Fragment des Ad12 Genoms gemeinsam mit dem linearisierten p7-pBR322-Plasmid mit fraktionierten Kernextrakten aus BHK 21 Hamsterzellen inkubiert. p7 ist eine Präinsertionssequenz des BHK 21 Genoms, die schon einmal als Zielsequenz der adenoviralen DNA Integration gedient hatte (Stabel and Doerfler, 1982; Jessberger et al., 1989).

Die Verknüpfung zwischen den beiden DNA Substraten wurde mit zwei unterschiedlichen Verfahren nachgewiesen. Die gesamte *in vitro* Rekombinante konnte mit einem E. coli Transfektionsassay amplifiziert und nachgewiesen werden, die Verknüpfungsstellen innerhalb der *in vitro* Rekombinanten konnten außerdem mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden.

Im Verlauf der Reaktion wird die adenovirale DNA durch Interaktion kurzer homologer Sequenzen mit einem Reaktionspartner verknüpft. Dabei bestimmen die terminalen Nukleotidsequenzen der Reaktionspartner den Ort der Rekombination durch homologe Wechselwirkungen mit kurzen Sequenzen innerhalb des Partnermoleküls. Nur in wenigen Rekombinanten haben auch geringfügig vom Terminus verschobene Nukleotidsequenzen den Ort der Rekombination bestimmt.

Die Verknüpfung der DNA Fragmente ist begleitet vom Verlust von Nukleotiden, die Reaktion ist also nicht konservativ. Das Ausmaß der Deletionen ist nicht zufällig, sondern hängt von der Lage der interagierenden kurzen Sequenzhomologien ab. In den rekombinanten Molekülen sind die zwischen den interagierenden Sequenzhomologien liegenden Sequenzen und eine der Sequenzhomologien deletiert. Während also von der Nukleotidsequenz des einen Rekombinationspartners stets nur wenige Basenpaare deletiert werden, können im Partner mehrere Kbp deletiert werden. Insertionen sind nicht beobachtet worden.

Ununterbrochene kurze Sequenzhomologien wurden häufiger an den Verknüpfungsstellen gefunden als unterbrochene, auch wenn diese zum Teil ausgedehnter waren. Die längsten ununterbrochenen Sequenzhomologien hatten eine Länge von neun Basenpaaren; ausgedehntere, nicht unterbrochene kurze Sequenzhomologien waren in den beiden eingesetzten Fragmenten nicht vorhanden. Ausgedehntere, dafür unterbrochene Homologien legen nahe, daß der Rekombinationsapparat möglicherweise aber längere homologe Abschnitte erfassen kann.

Bei kurzen Sequenzhomologien mit ähnlicher Anordnung der homologen Nukleotide sind diejenigen Kombinationen begünstigt, die zum geringsten Verlust an

Nukleotiden führen. Offenbar startet die Suche nach kurzen Sequenzhomologien am DNA Ende des Partners.

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens kurzer Sequenzhomologien in einer Zielsequenz ist auch abhängig von der Basenzusammensetzung der Zielsequenz. Je ähnlicher die Basenzusammensetzung der Zielsequenz der Basenzusammensetzung der terminalen Nukleotidsequenz ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von kurzen homologen Abschnitten und desto höher ist die Rekombinationsfrequenz.

Die beschriebene Aktivität ist nicht nur in Hamsterzellen, sondern auch in menschlichen Zellen nachgewiesen worden. Die Rekombinationsaktivität steht der Ad12 DNA daher sowohl während der abortiven Infektion von Hamsterzellen, als auch während der produktiven Infektion von menschlichen Zellen zur Verfügung.

Die Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten gleichen einigen der Verknüpfungsstellen aus Ad12-induzierten Tumoren und Ad12-transformierten Zelllinien sehr genau. Es ist daher sehr wohl denkbar, daß der Rekombinationsapparat des zellfreien Systems auch zur Integration adenoviraler DNA in das Wirtsgenom beiträgt. Möglicherweise führen auch andere Rekombinationswege zur Integration viraler DNA; ebenso ist es denkbar, daß Rearrangements den ursprünglichen Integrationsmechanismus verschleiern.

Die Untersuchung der Makroumgebungen der Integrationsorte adenoviraler DNA in einigen Ad-transformierten Zelllinien zeigt, daß adenovirale DNA nicht bevorzugt in bestimmte Isochoren integriert. Die Integration ist nicht immer isopyknisch, in der Mehrzahl der Fälle ist sie sogar deutlich nicht-isopyknisch. In der Ad12-transformierten Zelllinie T637 ist die adenovirale DNA in GC-arme, nicht der viralen Basenzusammensetzung entsprechenden Regionen des Wirtsgenoms integriert. Entsprechendes gilt für die Lokalisierung der adenoviralen DNA in der Ad2-transformierten Zelllinie HE5. Demgegenüber legen Experimente zu den Tumorzelllinien CLAC1 und T1111(2) eine nahezu isopyknische Integration der Ad12 DNA nahe. In diesen Zelllinien war die adenovirale DNA instabil, große Teile der viralen DNA gingen hier verloren. Möglicherweise beeinflußt die Basenzusammensetzung am Integrationsort die Stabilität der integrierten DNA mit.

Literaturverzeichnis

- Angeletti, P.C. and Engler, J.A. (1998)
Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix
J. Virol. **72**, 2896-2904
- Ansorge, W. (1983)
Fast visualisation of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate.
in: Stathakos, D. ed., Elektrophoresis '82, pp.235-242; de Gruyter, Berlin
- Bablanian, R., Eggers, H.J., and Tamm, I. (1965)
Studies on the mechanism on poliovirus-induced cell damage. I. The relation between poliovirus-induced metabolic and morphological alteration in cultured cells
Virology **26**, 100-113
- Baczko, K., Neumann, R. and Doerfler, W. (1978)
Intracellular Forms of Adenovirus DNA: VII. Excision of viral sequences from cellular DNA in Adenovirus Type 2-infected KB cells
Virology **85**, 557-567
- Baumann, P. and West, S.C. (1998)
DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts
Proc. Natl. Acad.Sci. USA **95**, 14066-14070
- Been, M.D., Burgess, R.R., and Champoux, J.J. (1984)
Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type I DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA
Nucleic Acids Research **12**, 3097-3114
- Berger, R., Bloomfield, C.D. and Sutherland, G.R. (1986)
Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites
Cytogenet. Cell. Genet. **40**, 490-535
- Bernardi, G. (1995)
The Human Genome: Organization and Evolutionary History.
Annu. Rev. Genetics **29**:445-76
- Bernardi, G. (2000).
Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates.
Gene **241** 3-17
- Bernardi, G. (2001)
Misunderstandings about isochores: a review. Part I
Gene **276(1-2)**, 3-13.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1522
- Bøe, S.O., Sodrski, J., Helland, D.E. and Farnet, C.M. (1995)
DNA end-joining in extracts from human cells
Biochem. Biophys. Res. Comm. **215**, 987-993

- Bolivar, F., Rodriguez, R., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., and Boyer, H.W. (1977)
Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system
Gene **2**, 121-131
- Bonven, B.J., Gocke, E., and Westergaard, O. (1985)
A high affinity topoisomerase I binding sequence is clustered at DNAase I hypersensitive sites in tetrahymena r-chromatin.
Cell **41**, 541-551
- Boulton, S.J. and Jackson, S.P. (1996)
Saccharomyces cerevisiae Ku 70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways
EMBO J. **15**, 5093-5103
- Boyd, K.E. and Farnham, P.J. (1997)
Myc versus USF: discrimination at the cad gene is determined by core promoter elements
Mol. Cell. Biol. **17**, 2529-2537
- Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. **72**, 248-254
- Bullock, P., Forrester, W., and Botchan, M. (1984)
DNA sequence studies of simian virus 40: chromosomal excision and integration in rat cells
J. Mol. Biol. **174**, 55-84
- Büntemeyer, H., Bödecker, B.G.D., and Lehmann, J. (1987)
Membrane-stirrer-reactor for bubble free aeration and perfusion
in: Sier, R.E., and Griffith, J.B., eds., Modern approaches to animal cell technology, pp. 411-419. Butterworth, Sevenoaks
- Burger, H. and Doerfler, W. (1974)
Intracellular forms of adenovirus DNA: III. Integration of the DNA of Adenovirus Type 2 into host DNA in productively infected cells
J. Virol. **13**, 975-992
- Burlingham, B.T. and Doerfler, W. (1971)
Three size classes of intracellular adenovirus deoxyribonucleic acid
J. Virol. **7**, 707-719
- Casey, G., Smith, R., McGillivray, D., Peters, G., and Dickson, C. (1986)
Characterization and chromosome assignment of the human homolog of 'int-2', a potential proto-oncogene
Mol. Cell. Biol. **6**, 502-510
- Chen, C., Choo, K., Cheng, W. (1995)
Frequent deletions and sequence aberrations at the transgene junctions of transgenic mice carrying the papillomavirus regulatory and the SV40 TAG gene sequences
Transgenic Res. **4**, 52-59
- Conley, E., Saunders, V., and Saunders, J. (1986)
Deletion and rearrangement of plasmid DNA during transformation of Escherichia coli with linear plasmid molecules
Nucl. Acid Res. **14**, 8905-17

- Conley, E., Saunders, V., Jackson, V., and Saunders, J. (1986)
Mechanism of intramolecular recyclization and deletion formation following transformation of Escherichia coli with linearized plasmid DNA
Nucl. Acid Res. **14**, 8919-32
- Critchlow, S.E. and Jackson, S.P. (1998)
DNA end-joining: from yeast to man.
Trends Biochem. Sci. **23**, 394-398
- Clark, A.J., and Margulies, A.D. (1965)
Isolation and characterization of recombination-deficient mutants of Escherichia coli K 12
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **53**, 451-459
- Cook, J.L., and Lewis, A.M. (1979)
Host response to adenovirus 2-transformed hamster embryo cells
Cancer Research **39**, 1455-1461
- Corneo, G., Ginelli, E., Soave, C., Bernardi, G. (1968)
Isolation and characterization of mouse and guinea pig satellite deoxyribonucleic acids.
Biochemistry **7**, 4373-4379
- Cuny, G., Soriano, P., Macaya, G., and Bernardi, G. (1981)
The major components of the mouse and human genomes: preparation, basic properties and compositional heterogeneity.
Eur. J. Biochem. **115 (2)**, 227-233
- Dagert, M. and Ehrlich, S.D. (1974)
Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of Escherichia coli cells
Gene **6**, 23-28
- Daza, P., Reichenberger, S., Göttlich, B., Hagmann, M., Feldmann, E., and Pfeiffer, P. (1996)
Mechanisms of nonhomologous DNA end-joining in frogs, mice and men
Biol. Chem. **377**, 775-786
- De Sario, A., Geigl, E.-M. and Bernardi, G. (1995)
A rapid procedure for the compositional analysis of yeast artificial chromosomes
Nucl. Acids Res. **23**, 4013-4014
- de Vries, E., van Driel, W., Bergsma, W.G., Arnberg, A.C., van der Vliet, P. (1989)
HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex
J. Mol. Biol. **208**, 65-78
- Deuring, R., Klotz, G., and Doerfler, W. (1981a)
An unusual symmetric recombinant between adenovirus type 12 DNA and human cell DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 3142-3146
- Deuring, R., Winterhoff, U., Tamanoi, F., Stabel, S., and Doerfler, W. (1981b)
Site of linkage between adenovirus type 12 and cell DNAs in hamster tumor cell line CLAC3
Nature **293**, 81-84
- Deuring, R., and Doerfler, W. (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

- Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O. (1984)
A comprehensive set of sequence analysis programs for the Vax
Nucl. Acids Res. **12**, 387-395
- Doerfler, W. (1968)
The fate of DNA of adenovirus type 12 in baby hamster kidney cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **60**, 636-643
- Doerfler, W. (1969)
Non-productive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12
Virology **38**, 587-606
- Doerfler, W. (1970)
Integration of DNA of adenovirus type 12 into the DNA of baby hamster kidney cells
J. Virol. **6**, 652-666
- Doerfler, W., and Lundholm, U. (1970)
Absence of replication of the DNA of adenovirus type 12 in BHK21 cells
Virology **40**, 754-757
- Doerfler, W. (1975)
Integration of viral DNA into the host genome
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **71**, 1-78
- Doerfler, W., Baczko K., Burger, H., Fanning, E., Groneberg, J., Ortin, J., Scheidtmann, K.H., Schick, J., and Soboll, H. (1977)
Integration of adenovirus DNA into the host genome
Bulletin de l'institut Pasteur, **75**, 141-185
- Doerfler, W., Stabel, S., Ibelgaufits, H., Sutter, D., Neumann, R., Groneberg, J., Scheidtmann, K.H., Deuring, R. and Winterhoff, U. (1980)
Selectivity in integration sites of adenoviral DNA
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Volume XLIV
- Doerfler, W. (1982)
Uptake, fixation and expression of foreign DNA in mammalian cells: the organisation of integrated adenovirus DNA sequences
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **101**, 127-194
- Doerfler, W. (1983)
DNA methylation and gene activity
Annu. Rev. Biochem. **52**, 93-124
- Doerfler, W., Gahlmann, R., Stabel, S., Deuring, R., Lichtenberg, U., Schulz, M., Eick, D., and Leisten, R. (1983)
On the mechanism of recombination between adenoviral and cellular DNAs: The structure of junction sites
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **109**, 193-228
- Doerfler, W., ed. (1984)
The molecular biology of adenoviruses, Bd 1-3
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **110**.
- Doerfler, W. (1991a)
Patterns of DNA methylation - evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism - A proposal
Biol. Chem. Hoppe-Seyler **372**, 557-564

- Doerfler, W. (1991b)
The 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
- Doerfler, W. (1992)
Transformation of cells by adenoviruses: Less frequently discussed mechanisms
In: Doerfler, W., and Böhm, P., eds., Malignant Transformation by DNA Viruses: Molecular Mechanisms, pp.87-109. Verlag Chemie, Weinheim
- Doerfler, W. (1993)
Adenoviral DNA integration and changes in DNA methylation patterns: a different view of insertional mutagenesis
Prog. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol. **46**, 1-36
- Doerfler, W., and Böhm, P., eds. (1993)
Virus Strategies
Verlag Chemie, Weinheim
- Doerfler, W. (1996)
A new concept in (adenoviral) oncogenesis: Integration of foreign DNA and its consequences
BBA **1288**, F79-F99
- Doerfler, W., Orend, G., Schubbert, R., Fechteler, K., Heller, H., Wilgenbus, P., and Schröer, J. (1995)
On the insertion of foreign DNA into mammalian genomes: mechanism and consequences
Gene **157**, 241-245
- Douady, C., Carels, N., Clay, O., Catzeflis, F., and Bernardi, G. (2000)
Diversity and Phylogenetic Implications of CsCl Profiles from Rodent DNAs.
Mol. Phyl. and Evol. **17**, 219-230
- Eick, D., Stabel, S., and Doerfler, W. (1980)
Revertants of adenovirus type 12-transformed hamster cell T637 as tools in the analysis of integration patterns
J. Virol. **36**, 41-49
- Eick D., and Doerfler, W. (1982)
Patterns of integration of adenovirus type 12 DNA: rearrangements on the right terminus of the viral genome in cell line T637
J. Virol. **42**, 317-321
- Eick, D., Kemper, B. and Doerfler, W. (1983)
Excision of amplified viral DNA at palindromic sequences from the adenovirus type 12-transformed hamster cell line T637
EMBO J. **2**, 1981-1986
- Eickbrush, T.H., and Moudrianakis, E.N. (1978)
The compaction of DNA helices into either continuous supercoils or folded-fiber rods and toroids.
Cell **13**, 295-306
- Fanning, E. and Doerfler, W. (1976)
Intracellular Forms of Adenovirus DNA: V. Viral DNA sequences in hamster cells abortively infected and transformed with human adenovirus type 12
J. Virol. **20**, 373-383

- Fanning, E. and Doerfler, W. (1977)
Intracellular forms of Adenovirus DNA: VI. Quantitation and characterization of the four size-classes of adenovirus type 2 DNA in human KB Cells
Virology **81**, 433-448
- Featherstone, C. and Jackson, S.P. (1999)
DNA repair: Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions ?
Mutat. Res. **434**, 3-15
- Fechteler, K., Tatzelt, J., Huppertz, S., Wilgenbus, P., and Doerfler, W. (1995)
The mechanism of adenovirus DNA integration: studies in a cell-free system
Curr.Top.Microbiol.Immunol. **199/II**, 109-137; SpringerVerlag, Berlin&Heidelberg
- Fechteler, K. (1996)
Untersuchungen zur Integration von Adenovirus DNA in das Säugergenom: Reinigung und Charakterisierung eines Multi-Proteinkomplexes aus einem zellfreien System
Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln
- Federico, C., Saccone, C., Bernardi, G., (1998)
The gene-richest bands of human chromosomes replicate at the onset of the S-phase.
Cytogenet. Cell Genet. **80**, 83-88
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983)
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity
Anal. Biochem. **132**, 6-13
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1984)
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity
Anal. Biochem. **137**, 266-267
- Fishel, R., Derbyshire M.K., Moore, S.P. and Young, C.S.H. (1991)
Biochemical studies of homologous and nonhomologous recombination in human cells
Biochimie **73**, 257-267
- Fredman, J.N. and Engler, J.A. (1993)
Adenovirus precursor to terminal protein interacts with the nuclear matrix in vivo and in vitro
J. Virol **67**, 3384-3395
- Frenkel, L., and Bremer, H. (1986)
Increased amplification of plasmids pBR322 and pBR327 by low concentrations of chloramphenicol
DNA **5**, 539-44
- Gahlmann, R., Leisten, R., Vardimon, L., and Doerfler, W. (1982)
Patch homologies and the integration of adenovirus DNA in mammalian cells
EMBO J. **1**, 1101-1104
- Gahlmann, R., and Doerfler, W. (1983)
Integration of viral DNA into the genome of the adenovirus type 2-transformed hamster cell line HE5 without loss or alteration of cellular nucleotides
Nucleic Acids Res. **11**, 7347-7361
- Gahlmann, R., Schulz, M., and Doerfler, W. (1984)
Low molecular weight RNAs with homologies to cellular DNA at sites of adenovirus DNA insertion in hamster or mouse cells
EMBO J. **3**, 3263-3269

- Gasser, S.M. and Laemmli, U. (1987)
A glimpse at chromosomal order
TIG **3**, 16-22
- Ginsberg, H.S., ed. (1985)
Adenoviruses
Plenum Press, New York
- Goedecke, W., Eijpe, M., Offenberg, H.H., van Aalderen, M. and Heyting, C. (1999)
Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis
Nature Genet. **23**, 194-198
- Göttlich, B., Reichenberger, S., Feldmann, E., and Pfeiffer, P. (1998)
Rejoining of DNA double-strand breaks in vitro by single-strand annealing
Eur. J. Biochem **258**, 387-395
- Green, M., and Piña, M. (1964)
Biochemical studies on adenovirus multiplication, VI. Properties of highly purified tumorigenic human adenovirus and their DNAs
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **51**, 1251-1259
- Groneberg, J., Sutter, K., Soboll, H., and Doerfler, W. (1978)
Morphological revertants of adenovirus type 12-transformed hamster cells.
J. Gen. Virol **40**, 635-645
- Groneberg, J., and Doerfler, W., (1979)
Revertants of adenovirus type 12-transformed hamster cells have lost part of the viral genome
Int. J. Cancer **24**, 67-74
- Grunstein, M., and Hogness, D.S. (1975)
Colony hybridisation: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3961-3965
- Günthert, U., Schweiger, M., Strupp, M. and Doerfler, W. (1976)
DNA methylation in adenovirus, adenovirus-transformed cells and host cells.
Proc. Natl. Acad.Sci. USA **73**, 3923-3927
- Guo, B., Odgren, P.R., van Wijnen, A.N., Last, T.J., Nickerson, J., Penman, S., Lian, J.B., Stein, J.L. and Stein, G.S. (1995)
The nuclear matrix protein NMP-1 is the transcription factor YY1
Proc. Natl. Acad. Sci USA **92**, 10526-10530
- Gusew, N., Nepveu, A., and Chartrand, P. (1987)
Linear DNA must have free ends to transform rat cells efficiently
Mol. Gen. Genet. **206**, 121-125
- Gutai, M.W., and Nathans, D. (1978)
Cellular DNA sequences and sequences at recombinant joints of substituted variants
J. Mol. Biol. **126**, 275-288
- Haber, J. E. (1999)
DNA recombination: the replication connection
Trends Biochem. Sci. **24**, 271-275
- Hammarskjöld, M.L. and Winberg, G. (1980)
Encapsidation of adenovirus 16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome
Cell **20**, 787-795

- Hammarskjöld, M.L. and Winberg, G. (1983)
Further characterization of the packaging sequence of Ad16
Gulbenkian Workshop on the Molecular Biology of Adenoviruses, Sintra, Portugal
- Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids
J. Mol. Biol. **166**, 557-580
- Hartley, K.O., Gell, D., Smith, G.C.M., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M.A., Admon, A., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., and Jackson, S.P. (1995)
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product
Cell **82**, 849-856
- Harui, A. Suzuki, S., Kochanek, S. and Mitani, K. (1999)
Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors
J. Virol. **73**, 6141-6146
- Harvey, G. and Pearson, C.K. (1988)
Search for multienzyme complexes of DNA precursor pathways in uninfected mammalian cells and in cells infected with herpes simplex virus type I
J. Cell. Physiol. **134**, 25-36
- Heller, H., Kämmer, C., Wilgenbus, P., and Doerfler, W. (1995)
Chromosomal insertion of foreign (adenovirus type 12, plasmid, or bacteriophage I) DNA is associated with enhanced methylation of cellular DNA segments
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 5515-5519
- Heyer, W.-D, Kolodner, R.D. (1993)
Enzymology of homologous recombination in saccharomyces cerevisiae
Prog. Nucl. Acid. Research **46**, 221-271
- Hilger-Eversheim, K. and Doerfler, W. (1997)
Clonal origin of adenovirus type 12-induced hamster tumors: non specific chromosomal integration sites of viral DNA
Cancer Research, **57**, 3001-3009
- Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981)
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids
Anal. Biochem. **114**, 193-197
- Huebner, R.J., Rowe, W.P. and Lane, W.T. (1962)
Oncogenic effects in hamsters of human adenovirus types 12 and 18
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **48**, 2051-2058
- Hyrien, O., Debatisse, M., Buttin, G., and de Saint Vincent, B.R. (1987)
A hotspot for novel amplification joints in a mosaic of Alu-like repeats and palindromic A+T rich DNA
EMBO **6**, 2401-2408
- Jackson, S.P. and Jeggo, P.A. (1995)
DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK
Trends Biochem Sci **20**, 412-415
- Javier, R., Raska, K., MacDonald, G.J. and Shenk, T. (1991)
Human adenovirus type 9 induced rat mammary tumors
J. Virol **65**, 3192-3202

- Javier, R., Raska, K. and Shenk, T. (1992)
Requirements for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors
Science **257**, 1267-1271
- Jeggo, P.A. (1990)
Studies on mammalian mutants defective in rejoining double strand breaks in DNA
Mutat. Res **239**, 1-16
- Jeggo, P.A. (1998)
Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells
Radiat. Res **150**, S80-S91
- Jessberger, R., Weisshaar, B., Stabel, S., and Doerfler, W. (1989a)
Arrangement and expression of integrated adenovirus type 12 DNA in the transformed hamster cell line HA12/7: amplification of Ad12 and c-myc DNAs and evidence for hybrid viral-cellular transcripts
Virus Res. **13**, 113-128
- Jessberger, R., Heuss, D., and Doerfler, W. (1989b)
Recombination in hamster cell nuclear extracts between adenovirus type 12 DNA and two hamster preinsertion sequences
EMBO J. **8**, 869-878
- Jozuka, K., and Ogawa, H. (1995)
*Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *saccharomyces cerevisiae**
Genetics **139**, 1521-1532
- Karran, P. (2000)
DNA double strand break repair in mammalian cells
Curr. Opin. Genet. Dev. **10**, 144-150
- Khanna, K.K. and Jackson S.P. (2001)
DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection
Nature Genet. **27**, 247-254
- Kerem, B.S., Goiten, R., Diamond, G., Cedar, H. and Marcus, M. (1984)
Mapping of DNase I sensitive regions of mitotic chromosomes.
Cell **38**, 493-499
- Kettmann, R., Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Cuny, G., Ghysdael, J., Mammerickx, M., Burny, A. and Bernardi, G. (1979)
Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4822-4826
- Kettmann, R., Cleuter, Y., Mammerickx, M., Meunier-Rotival, M., Bernardi, G., Burny, A. and Chantrenne, H. (1980)
Genomic integration of bovine leukemia provirus: comparison of persistent lymphocystosis with lymph node tumor form of enzootic bovine leukosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 2577-2582
- Knoblauch, M., Schröer, J., Schmitz, B., and Doerfler, W. (1996)
The structure of integration sites of adenovirus type 12 DNA in the hamster cell genome
J. Virol. **70**, 3788-3796
- Koetsier, P.A., Schorr, J., and Doerfler, W. (1993)
A rapid optimized protocol for downward alkaline southern blotting of DNA
Biotechniques **15**, 260-262

- Koetsier, P.A., and Doerfler, W. (1996)
A simple device to prevent contamination during spin-column gel filtration
TiG **12**, 339
- Kudo, S., Sugisaki, H., Takanami, M., Yamashita, T., Ishino, M., Shimizu, Y., Iida, Y., and Fujinaga, K. (1986)
Structure of viral DNA in a rat cell line, GY1, transformed by Ad 12 HindIII fragment-G
Virology **148**, 123-145
- Kuhlmann, I., Achten, S., Rudolph, R. and Doerfler, W. (1982)
Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: Loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation
EMBO J **1**, 79-86
- Kuhlmann, I. and Doerfler, W. (1983)
Loss of viral genomes from hamster tumor cells and nonrandom alterations in patterns of methylation of integrated adenovirus type 12 DNA
J. Virol. **47**, 631-636
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**, 680-685
- Lehman, C.W., Trautman, J.K. and Carroll, D. (1994)
Illegitimate recombination in Xenopus: characterisation of end-joined junctions.
Nucl. Acids Res. **22**, 434-442
- Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J. and Jasin, M. (1998)
Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 5172-5177
- Lichtenberg, U., Zock, C., and Doerfler, W. (1987)
Insertion of adenovirus type 12 DNA in the vicinity of an intracisternal A particle genome in Syrian hamster tumor cells
J. Virol. **61**, 2719-2726
- Lieber, M.R., Grawunder, U., Wu, X., and Yaneva, M. (1997)
Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks
Curr. Opin. Genet. Dev. **7**, 99-104
- Lin, F.L., Sperle, K., and Sternberg, N. (1984)
Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process
Mol. Cell. Biol. **4**, 1020-1034
- Macaya, G., Thiery, J.P. and Bernardi, G. (1976)
An approach to the organisation of eukaryotic genomes at a macromolecular level.
J. Mol. Biol. **108**, 237-254
- Macpherson, A. and Stoker, M.G.P. (1962)
Virology **16**, 147
- Mandel, M. and Higa, A. (1970)
Calcium-dependent bacteriophage DNA infection
J. Mol. Biol. **53**, 159-162

- Mason, R.M., Thacker, J. and Firman, M.P. (1996)
The joining of non-complementary DNA double-strand breaks by mammalian cell extracts.
Nucl. Acids Res. **24**, 4946-4953
- McAlpine, P.J., Van Cong, N., Boucheix, C., Pakstis, A.J., Doute, R.C., and Shows, T.B. (1987)
The 1987 catalogue of mapped genes and report of the Nomenclature Committee. Ninth International Workshop on human gene mapping
Cytogenet. Cell. Genet. **46**, 29-101
- McDonnell, M., Simon, M.N., and Studier, F.W. (1977)
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels
J. Mol. Biol. **110**, 119-123
- McDougall, J.K. (1971)
Adenovirus-induced chromosome aberrations in human cells
J. Gen. Virol. **12**, 43-51
- McDougall, J.K., Dunn, A.R., and Jones, K.W. (1972)
In situ hybridization of adenovirus RNA and DNA
Nature **236**, 346-348
- McFarlane, M. and Wilson, J.B. (1996)
A model for the mechanism of precise integration of a microinjected transgene
Transgenic Res. **5**, 171-177
- Meyers, J.A., Sanchez D., Elwell, L.P., and Falkow, J. (1976)
Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid
J. Bacteriol. **127**, 1529-1537
- Mirkovitch, J. Miralult, M.E. and Laemmli (1984)
Organization of the higher-order chromatin loop: Specific DNA attachment sites on nuclear scaffold
Cell **39**, 223-232
- Mouchiroud, D., D'Onofrio, G., Assani, B., Macaya, G., Gautier, G. and Bernardi, G. (1991)
The distribution of genes in the human genome.
Gene **100**, 181-187
- Müller, K., Heller, H., and Doerfler, W. (2001)
Foreign DNA Integration
J. Biol. Chem. **276**, 14271-14278
- Muratani, K., Hada, T., Yamamoto, Y., Kaneko, T., Shigeto, Y., Ohue, T., Furuyama, J., and Higashino, K. (1991)
Inactivation of cholinesterase by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 11315-11319
- Nevis, J.R. and Wilson, M.C. (1981)
Regulation of adenovirus 2 gene expression at the level of transcriptional termination and RNA processing
Nature **290**, 113-118
- Nicolás, A.L., and Young, C.S.H. (1994)
Characterization of DNA end joining in a mammalian cell nuclear extract: junction formation is accompanied by nucleotide loss, which is limited and uniform but not site specific
Mol. Cell. Biol. **14**, 170-180

- Nicolás, A.L., Munz, P.L., and Young, C.S.H. (1995)
A modified single-strand annealing model best explains the joining of DNA double-strand breaks in mammalian cells and cell extracts
Nucl. Acids Res. **23**, 1036-1043
- Odelberg, S.J., Weiss, R.B. Hata, A., and White, R. (1995).
Template-switching during DNA synthesis by Thermus aquaticus DNA polymerase I
Nucl. Acids Res. **23**, 2049-2057
- Orend, G., Kuhlmann, I. and Doerfler, W. (1991)
Spreading of DNA methylation across integrated foreign (adenovirus type 12) genomes in mammalian cells
J. Virol. **65**, 4301-4308
- Orend, G (1994)
Untersuchungen zur Integration und de novo Methylierung der viralen DNA in Adenovirus Typ 12 transformierten Hamster (Tumor)-Zellen
Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln
- Orend, G., Linkwitz, A., and Doerfler, W. (1994)
Selective sites of adenovirus (foreign) DNA integration into the hamster genome changes in integration patterns
J. Virol. **68**, 187-194
- Orend, G.; Knoblauch, M., Kämmer, C., Tija, S., Schmitz, B., Linkwitz, A., Meyer zu Altenschildesche, Maas, J., and Doerfler, W. (1995a)
The initiation of de novo methylation of foreign DNA integrated into a mammalian genome is not exclusively targeted by nucleotide sequence
J. Virol. **69**, 1226-1242
- Orend, G., Knoblauch, M., and Doerfler, W. (1995b)
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
- Pääbo, S, Irwin, D.M., and Wilson A.C. (1990).
DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification
J. Biol. Chem. **265**, 4718-4721
- Paull T.T. and Gellert, M. (2000)
A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 6409-6914
- Pearson, W.R., and Lipman, D.J. (1988)
Improved tools for biological sequence comparison
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 2444-2448
- Pfeffer, A., Schubbert, R., Orend, G., Hilger-Eversheim, K., and Doerfler, W. (1999)
Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype
Virus Res. **59**, 113-127
- Pfeiffer, P. and Vielmetter, W. (1988)
Joining of nonhomologous DNA double strand breaks in vitro
Nucl. Acids Res. **16**, 907-923

- Pfeiffer, P., Goedecke, W. and Obe, G. (2000)
Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations
Mutagenesis **15**, 289-302
- Popescu, N.C., Di Paolo, J.A. and Amsbaugh, S.C. (1987)
Integration site of human papilloma virus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes
Cytogenet. Cell. Genet. **39**, 58-62
- Reddy, G.P.V. and Fager, R.S. (1993)
Replitase: a complex integrating dNTP synthesis and DNA replication
Crit. Rev. Eukary. Gene Expression **3**, 255-277
- Remus, R., Kämmer, C., Heller, H., Schmitz, B., Schell, G., and Doerfler, W. (1999)
Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA-sequences
J. Virol. **73(2)**, 1010-1022
- Roberts, R.J., Akusjärvi, P., Aleström, R., Gelinas, E., Gingeras, T.R., Sciaky, D., and Pettersson, U. (1986)
A consensus sequence for the adenovirus-2 genome.
Dev. Mol. Virol. **8**, 1-51
- Robinson, A.J., Younghusband, H.B. and Bellett, A.J.D. (1973)
A Circular DNA-Protein Complex from Adenoviruses
Virology **56**, 54-69
- Rogozin, I.B., Glazko, G.V. and Glazkov, M.V. (2000)
Computer prediction of sites associated with various elements of the nuclear matrix
Brief Bioinform **1**, 33-44
- Romani, M., de Ambrosis, A., Alhadeff, B., Purrello, M., Gluzman, Y., and Siniscalco, M. (1990)
Preferential integration of the Ad5/SV40 hybrid virus at the highly recombinogenic human chromosome site 1p36
Gene **95**, 231-241
- Romani, M., Casciano, I., Querzola, F., de Ambrosis, A., and Siniscalco, M. (1993)
Analysis of a viral integration event in a CG-rich region at the 1p36 human chromosomal site
Gene **135**, 153-160
- Rosahl, T. und Doerfler, W. (1988)
Predominant association of adenovirus type 12 DNA with human chromosome 1 early in productive infection
Virology **162**, 494-497
- Roth, D. and Wilson, J. (1986)
Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction
Mol. Cell. Biol. **6**, 4295-4304
- Roth, D., and Wilson, J. (1988)
Illegitimate recombination in mammalian cells
In: Kucherlapati, R. and Smith, G.R. (Eds.), „Genetic Recombination“, 621-653, American Society for Microbiology, Washington, DC

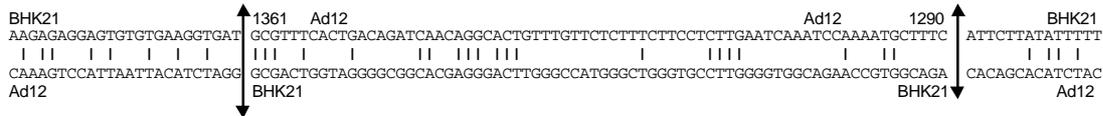
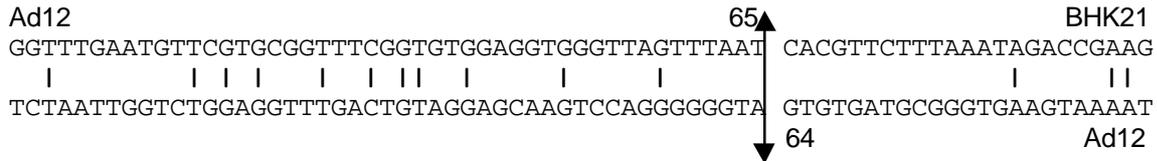
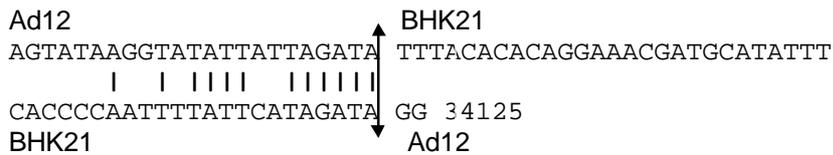
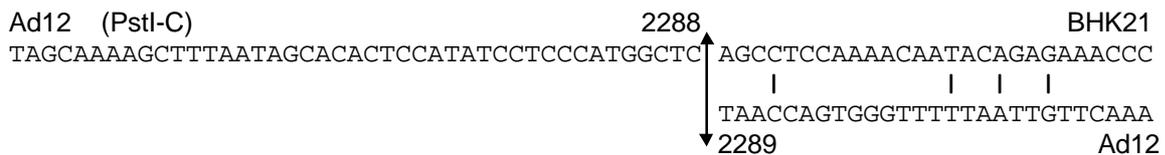
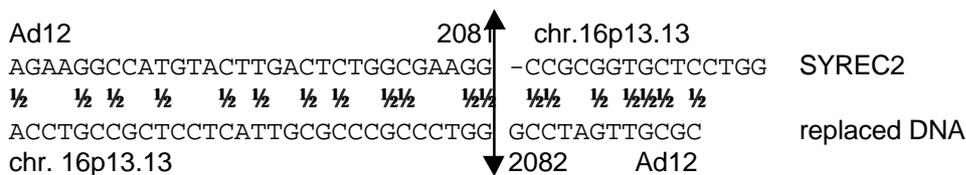
- Rynditch, A. V., Kadi, F., Zoubak, S., Svoboda, J., and Bernardi, G. (1991)
The isopycnic compartmentalised integration of Rous sarcoma virus sequences
Gene **106**, 165-172
- Rynditch A.V., Zoubak, S., Tsyba, L., Tryapitsina-Guley, N., and Bernardi, G. (1998)
The regional integration of retroviral sequences into the mosaic genome of mammals
Gene **222**, 1-16
- Saiki, R.J., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharff, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K., and Erlich, H.A. (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science **239**, 487-491
- Salinas, J., Zerial, M., Filipski, J., Crepin, M. and Bernardi, G. (1987)
Nonrandom distribution of MMTV proviral sequences in the mouse genome
Nucl. Acids Res. **15**, 3009-3022
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467
- Savageau, M.A., Metter, R., and Brockman, W.W. (1983)
Statistical significance of partial base-pairing potentials: implication for recombination of SV40 DNA in eukaryotic cells
Nucl. Acids Res. **11**, 6559-6570
- Schaack, J. Yew-Wai Ho, W., Freimuth, P. and Shenk, T. (1990)
Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA
Genes&Development **4**, 1197-1208
- Schellner, J., Stüber, K., and Doerfler, W. (1986)
Computer analyses on the structure of junction sites between adenovirus DNA and cellular DNA
BBA **867**, 114-123
- Scherdin, U., Rhodes, K., and Breindl, M. (1990)
Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration
J. Virol. **64**, 907-912
- Schick, J., Bacsko, K., Fanning, E., Groneberg, J., Burger, H., and Doerfler, W. (1976)
Intracellular forms of adenovirus DNA: Integrated form of adenovirus DNA appears early in productive infection
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **73**, 1043-1047
- Schick, J. and Doerfler, W. (1978)
Integration of adenovirus type 2 DNA in productively infected cells: results of sequential hybridization experiments
J. Gen. Virol. **43**, 217
- Schildkraut, C., Marmur, J. and Doty, P. (1962)
Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl.
J. Mol. Biol. **4**, 430-443
- Schlehofer, J.R. and zur Hausen, H. (1990)
Adenovirus infection induces amplification of persistent viral DNA sequences (simian virus 40, hepatitis B virus, bovine papillomavirus) in human and rodent cells
Virus Res. **17**, 53-60

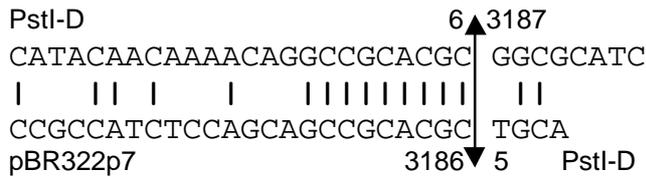
- Schorr, J., and Doerfler, W. (1993)
Non-homologous recombination between adenovirus and AcNPV DNA fragments in cell-free extracts from insect Spodoptera frugiperda nuclei
Virus Res. **28**, 153-170
- Schröder, J., I. Hölker, and W. Doerfler. (1997)
Adenovirus type 12 DNA firmly associates with mammalian 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. and Doerfler, W. (1984)
Deletion of cellular DNA at site of viral DNA insertion in the adenovirus type 12-induced mouse tumor CBA-12-1-T
Nucl. Acids Res. **12**, 4959-4976
- Schulz, M., Freisem-Rabien, U., Jessberger, R., and Doerfler, W. (1987)
Transcriptional Activities of mammalian genomes at sites of recombination with foreign DNA
J. Virol. **61**, 344-353
- Shapiro, D.J., Sharp, P.A., Wahl, W.W., and Keller, M.J. (1988)
A high efficiency HeLa cell nuclear transcription extract
DNA **7**, 47-55
- Shimizu, H., Yamaguchi, H., Ashizawa, Y., Kohno, Y., Asami, M., Kato, J. and Ikeda, H. (1997)
Short-homology independent illegitimate recombination in Escherichia coli: distinct mechanism from short-homology-dependent illegitimate recombination
J. Mol. Biol. **266**, 297-305
- Southern, E.M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis
J. Mol. Biol. **98**, 503-517
- Spitzner, J.R., and Muller, M.T. (1988)
A consensus sequence for cleavage by vertebrate DNA topoisomerase II
Nucl. Acids Res. **16**, 5533-5556
- Sprengel, J., Schmitz, B., Heuss-Neitzel, D., Zock, C., and Doerfler, W. (1994)
Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: Comparative functional analysis
J. Virol. **68**, 379-389
- Stabel, S., Doerfler, W., and Friis, R.R. (1980)
Integration sites of adenovirus type 12 in transformed hamster cells and hamster tumor cells
J. Virol. **36**, 22-40
- Stabel, S., and Doerfler, W. (1982)
Nucleotide sequence at the site of junction between adenovirus type 12 DNA and repetitive hamster cell DNA in transformed cell line CLAC1
Nucl. Acids Res. **10**, 8007-8023
- Stabel, S., Argos, P., Phillipson, L. (1985)
The release of growth arrest by microinjection of adenovirus E1A DNA
EMBO J. **4**, 2329-2336
- Stewart, P.L., and Burnett, R.M. (1996)
Adenovirus structure by X-ray crystallography and electron microscopy
In: Current Topics Microbiol. Immunol. **199/II**, Springer-Verlag, Berlin

- Stich, H.F. and Yohn, D.S. (1967)
Mutagenic capacity of adenoviruses for mammalian cells
Nature **216**, 1292-1294
- Stoker, M., and MacPherson, I. (1984)
Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives
Nature **201**, 1355-1357
- Stringer, J.R. (1981)
Integrated simian virus 40 DNA: Nucleotide sequences at cell-virus recombinant junctions
J. Virol. **38**, 671-679
- Stringer, J.R. (1982)
DNA sequence homology and chromosomal deletion at a site of SV40 DNA Integration
Nature **296**, 363-366
- Strohl, W.A., Rouse, H.C., Teets, K., and Schlesinger, R.W. (1970)
The response of BHK21 cells to infections with type 12 adenoviruses. III. Transformation and restricted replication of superinfecting type 2 adenoviruses
Arch. Gesamte Virusforschung **31**, 93-112
- Sugino, A., Nitiss, J. Resnick, M.A. (1988)
Presynapsis and synapsis of DNA promoted by the STP alpha and single stranded DNA binding proteins from Saccharomyces cerevisiae
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 3683-87
- Sutter, D., Westphal, M., and Doerfler, W. (1978)
Patterns of integration of viral DNA sequences in the genomes of adenovirus type 12 transformed hamster cells
Cell **14**, 565-585
- Szybalski, W. (1968)
Use of caesium sulfate for equilibrium density gradient centrifugation.
In: Grossmann, L., Moldave, K. (eds) Methods in enzymology, part B, vol12, Academic Press, New York, pp 330-360
- Tan, S.-H., Bartsch, D., Schwarz, E., and Bernard, H.-U. (1998)
Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses
J. Virol. **72**, 3610-3622
- Tatzelt, J. (1992)
Über den Mechanismus der Insertion von Adenovirus DNA in das Säuger genom: Weiterentwicklung eines zellfreien Systems
Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln
- Tatzelt, J., Scholz, B., Fechteler, K., Jessberger, R., and Doerfler, W. (1992)
Recombination between adenovirus type 12 DNA and a hamster preinsertion sequence in a cell-free system
J. Mol. Biol. **226**, 117-126
- Tatzelt, J., Fechteler, K., Langenbach, P., and Doerfler, W. (1993)
Fractionated nuclear extracts from hamster cells catalyze cell-free recombination at selective sequences between adenovirus DNA and a hamster preinsertion site
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 7356-7360
- Tazi, J., Bird, A. (1990)
Alternative chromatin structure at CpG islands.
Cell **60**, 909-920

- Thacker, J., Chalk, J., Ganesh, A., and North, P. (1992)
A mechanism for deletion formation in DNA by human cell extracts: the involvement of short sequence repeats
Nucl. Acids Res. **20**, 6183-6188
- Thiery, J.P., Macaya, G., Bernardi, G. (1976)
An analysis of eukaryotic genomes by density gradient centrifugation.
J. Mol. Biol. **108**, 219-235
- Tishkoff, D.X., Filosi, N., Gaisa, G.M., Kolodner, R.D. (1997)
A novel mutation avoidance mechanism dependent on S. cerevisiae RAD27 is distinct from DNA mismatch repair
Cell **88**, 253-263
- Tolun, A., Aleström, P., and Petterson, U. (1979)
Sequence of inverted terminal repetitions from different adenoviruses: demonstration of conserved sequences and homology between SA7 termini and SV40 DNA
Cell **17**, 705-713
- Toth, M., Lichtenberg, U. and Doerfler, W. (1989)
Genomic sequencing reveals a 5-methyldeocytosine-free domain in active promoters and the spreading of preimposed methylation patterns
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 3728-3732
- Toth, M., Müller, U. and Doerfler, W. (1990)
The establishment of de novo DNA methylation patterns in mammalian cells: involvement of transcription factors analysed by genomic sequencing and footprinting
J. Mol. Biol. **214**, 673-683
- Tsukuda, T., Bauchwitz, R., and Holloman, W.K. (1989)
Isolation of the rec1 gene controlling recombination in Ustilago maydis
Gene **85**, 335-41
- van Dyck, E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. (1999)
Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein
Nature **398**, 728-731
- van Dyck, E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C. (2001)
Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing
EMBO reports **2**, 905-909
- Wagatsuma, M., Hashimoto, K., Matsukura, T. (1990)
Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences
J. Virol. **64**, 813-821
- Wahl, G.M., Stern, M., and Stark, G.R. (1979)
Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels and rapid hybridisation by using dextransulfate
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 3683-3687
- Wallace, M.R., Andersen, L.B., Saulino, A.M., Gregory, P.E., Glover, T.W., and Collins, F.S. (1991)
A de novo Alu insertion results in neurofibromatosis type 1
Nature **353**, 864-866
- Wang, J.C. (1996)
DNA topoisomerases
Annu. Rev. Biochem. **65**, 635-92

- Watson, N. (1988)
A new revision of the sequence of plasmid pBR322
Gene **70**, 399-403
- Wood, R.D. (1996)
DNA repair in eukaryotes
Annu. Rev. Biochem. **65**, 135-67
- Wronka, G. (1997)
Integrative Rekombination in einem zellfreien System aus Hamsterzellkernextrakten – Suche nach einem rekombinationsaktiven Komplex
Diplomarbeit am Institut für Genetik, Universität zu Köln
- Wu, C.S.C., Ikeda, K., and Yang, J.T. (1981)
Ordered conformation of polypeptides and proteins in acidic dodecylsulfate solution
Biochemistry **20**, 566-570
- Yip, M.C.M. and Knox, W.E. (1970)
Glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase: properties and distribution in normal and neoplastic rat tissues
J. Biol. Chem. **245**, 2199-2204
- Yunis, J.J., and Soreng, A.L. (1984)
Constitutive fragile sites and cancer
Science **226**, 1199-1204
- Yunis, J.J., Soreng, A.L., and Bowe A.E. (1987)
Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens
Oncogene **1**, 59-69
- Yunis, J.J. (1987)
Multiple recurrent genomic rearrangements and fragile sites in human cancer
Somat. Cell. Mol. Genet. **13**, 397-403
- Zeng, M., Cerniglia, G.J., Eck, S.L. and Stevens, C.W. (1997)
High-efficiency stable gene transfer of adenovirus into mammalian cells using ionizing radiation
Hum. Gene Ther. **8**, 1025-1032
- Zerial, M., Salinas, J., Filipski, J. and Bernardi, G. (1986)
Genomic localization of hepatitis B virus in a human hepatoma cell line.
Nucleic Acids Res. **14**, 8373-86
- Zoubak., S., Clay, O., Bernardi, G. (1996)
The gene distribution of the human genome.
Gene **174**, 95-102
- Zock, C. and Doerfler, W. (1990)
A mitigator sequence in the downstream region of the major late promoter of adenovirus type 12
EMBO J. **9**, 1615-1623
- Zock, C., Iselt, A. and Doerfler, W. (1993)
A unique mitigator sequence determines the species specificity of the major late promoter in adenovirus type 12 DNA
J. Virol **67**, 682-693

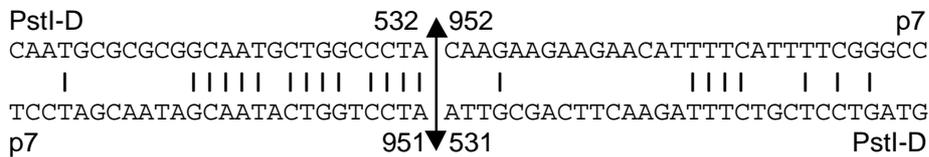
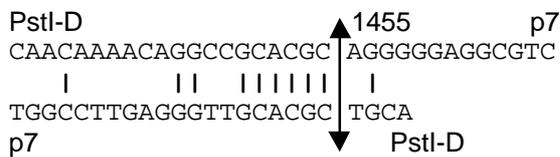
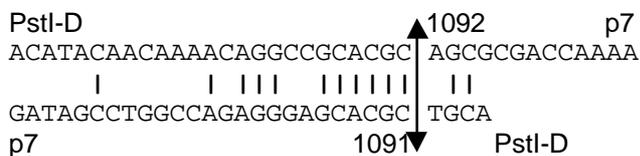
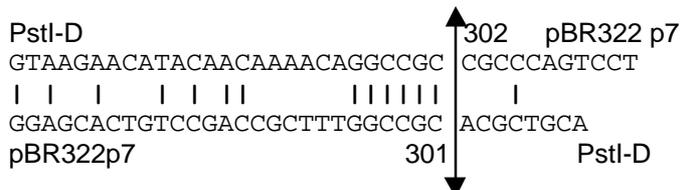
T1111(2) junction 1 and 2 (Lichtenberg et al., 1987)**T1111(2) junction 3****T637os2** (Knoblauch et al., 1996)**T191 os1** (Knoblauch et al., 1996)**SYREC 2** (Deuring and Doerfler, 1983)

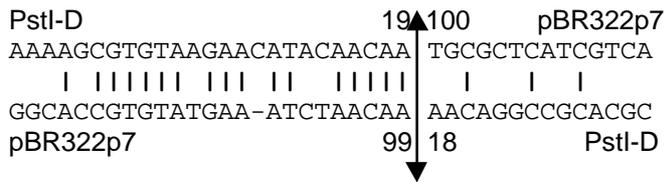
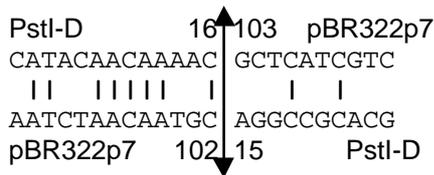
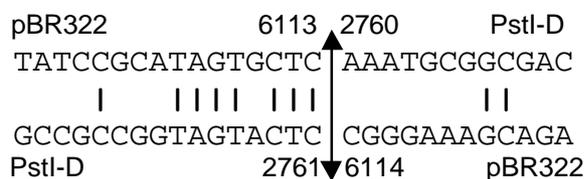
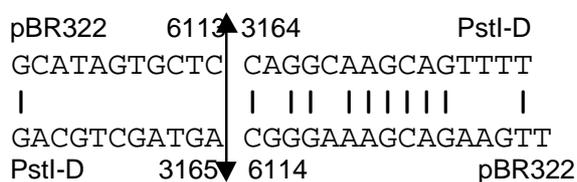


2.3, Fr.II

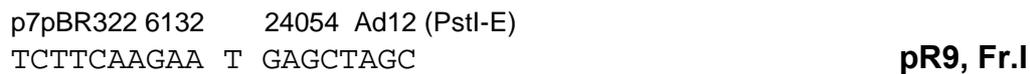


59.2.1; Fr.V

rec 10 fr.II**rec 18 fr.II****rec27 fr. II****rec9 fr. II**

rec20 (49.42) fr.II**rec36 fr. IV*****rec32 fr. IV*****rec55 fr. IV****B.2. Rechtsterminale Verbindungsstellen der in vitro Rekombinanten****45.1; Fr.II****49.42, rec9, rec20, ; Fr.II**

B.3. Verknüpfungsstellen zwischen dem PstI-G Fragment und p7pBR322



zu Anhang B:

Der obere Strang der dargestellten Verknüpfungsstellen stellt jeweils die rekombinante DNA dar. Im unteren Strang ist die jeweils verdrängte DNA abgebildet. Die Homologien zwischen der rekombinanten DNA und der jeweils verdrängten DNA sind durch Balken gekennzeichnet (und in einem Fall durch Unterstreichung der entsprechenden Nukleotide). Die Sequenzen der Rekombinanten rec 22, 27, 36, 50 stammen aus Tatzelt et al., 1993, die der Rekombinanten rec 9, rec18 und rec 29 aus der Dissertation von J. Tatzelt. Die Rekombinanten pR7-pR10 wurden von R. Jessberger isoliert und grob charakterisiert. Um die Verknüpfungsstellen dieser Rekombinanten zu sequenzieren, wurden aus den entsprechenden Glycerolkulturen frische Bakterienkulturen angeimpft und Plasmid-DNA präpariert. Diese wurde dann im Bereich der Verknüpfungsstellen sequenziert.

C. Die p7pbr322-Sequenz, 6132 Bp (Jessberger et al., 1989)

1 TTCTCATGTT TGACAGCTTA TCATCGATAA GCTTTAATGC GGTAGTTTAT
 45.1 ●↓ ●●↓ 49.42,
 51 CACAGTTAAA TTGCTAACGC AGTCAGGCAC CGTGTATGAA ATCTAACAAT rec20
 ●↓ rec32
 101 GCGCTCATCG TCATCCTCGG CACCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG
 151 CTTGGTTATG CCGGTACTGC CGGGCCTCTT GCGGGATATC GTCCATTCCG
 201 ACAGCATCGC CAGTCACTAT GGCGTGCTGC TAGCGCTATA TCGGTTGATG
 251 CAATTTCTAT GCGCACCCGT TCTCGGAGCA CTGTCCGACC GCTTTGGCCG
 ↓●rec9
 301 CCGCCCAGTC CTGCTCGCTT CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTACGCGA
 351 TCATGGCGAC CACACCCGTC CTGTGGATCA CGAGTTCGAG GCCAGCCTCG
 26 GGCTACACAT TTTTTTCTCC TCGCCTGGGG CCTGGCTGCA CTTTTTCGTC
 76 TCTCCCGTCT GCGCTCGGCT CTTTGCTTC GGCCTCTTT GCTCCGGCCT
 126 CGTCTTCAGC CCCGCTGCCC GCTTGCCACA ACCCCCCGTT GCCGTTGCCA
 176 TTGTCCCTGC CTCTGCCCCG TGCAGCCCCG CCGCCCCGCC GCCCGCCCGC
 ↓● rec36 ↓●●●●●●●●
 226 ACTCCACCGA CGCGGCCTCT CCGCAGCTTC GCACAAGCAG CAACCAGCTC pR5, pR6,
 rec22, rec50,
 276 CTCCCGCTTC CCTCGCTCTC CGCGTCCCGC GCTCAACCGT GGCCCGCCCT 52.1, PCR1
 326 CGGGAGACCC CACCGTGCCC TTCAGCCCTT TCTCCGGCGC CTGCCTCGCC
 376 CTGCCTCGCC TCCCCGGCTC CACCAGCAAG CGTCCCGCC AGACCGATGC
 ↓●● PCR 46.7, 1.19inf
 426 GCCGCAAGCC ACGCCTCCTC GTCCTCGCAA GCCGCAGCC GAGGTCTGGC
 476 CTGGTFTTCC CCGAGCCTCC CGCGCTCCGG CTCCGACTTG AAGGAGACGC
 ▼CLAC1
 526 CGCCCTCTCC GGGGGTGCGA GTGCCACCGG GGTCCTCCCC GACGACGCC
 576 ACGTCCTCTT TGGCCCTGCC TGTGCGTCGC CCCAGTGGC ACAGCCACTC
 626 CTTTGGCCTT GCTTGGCCTT GGCCTCTTCG GGGCTTCAT TCTACCCCA p7
 676 GGCCGTCTCC AACTTTTAGG AAACACCACG CCCTCGCCTT AGTTCGGACC
 726 ACCCTCTCC TCCCTTCTT CTTTCTTCC TTCCTTCCAT CCTTCTTCC
 776 TTCTTCTT CTTCTTCC TCCCTTCTT CCTTCTTCC TTCCTTCCGT
 826 CTTTCTTCT CTCTTCTCGT TTACAGCAGC AATAATAGAA ATAGTAGTAA
 876 TAGCAGCAGT AGTCGTGGGA GTGGAATAAC ATTATTAATA GCAAAAGTAC
 59.2.3 ●↓ ●↓rec10
 926 TCCTAGCAAT AGCAATACTG GTCCTACAAG AAGAAGAACA TTTTCATTTT

4301 CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
 4351 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT
 4401 TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA
 4451 CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT
 4501 AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT
 4551 GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG
 4601 GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
 4651 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC
 4701 TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG
 4751 TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT
 4801 GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT
 4851 TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC
 4901 CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AACTCACGT
 4951 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT
 5001 TTTAAATTA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA
 5051 CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG
 5101 ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGTTGCC TGAATCCCCG TCGTGTAGAT
 5151 AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC
 5201 CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
 5251 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT
 5301 CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA
 5351 ATAGTTTGCG CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC
 5401 TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTCCCAAC GATCAAGGCG
 5451 AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC
 5501 CTCCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT
 5551 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT
 5601 TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC
 5651 GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA
 5701 CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTTCGGGGCG

ORI

Amp^R

↑OOO HeLa 1(CE), 27.x, sshRA1

```

5751  AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA
5801  CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTTCT
5851  GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC
5901  GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA
5951  GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT
6001  TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC
6051  ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAAATA
6101  GCGTATCAC GAGGCCCTT CGTCTTCAAG AA
           ↑○○○○○           ↑○○
           45.1               52.1, rec27
           49.42             TT
           59.2.1           ○↑ rec18
           rec9
           rec20

```

zu Anhang C: Die Präinsertionssequenz p7 und das Gen der Ampicillinresistenz sind jeweils unterstrichen. Die Position der Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die der linksterminalen durch schwarze Pfeile, die der rechtsterminalen durch weisse Pfeile. Die CTT-Trinukleotide sind jeweils doppelt unterstrichen.

Quelle: rec 22, 27, 36, 50 J.Tatzelt et al., 1993
 rec9, 18, 20 Dissertation J.Tatzelt
 pR5, pR6 Jessberger et al., 1989

▼CLAC1: Integrationsort der Ad12 DNA im Tumor CLAC1; die Sequenz rechts von der Integrationsstelle wurde nach der Integration durch die Ad12 Sequenz ersetzt, die Sequenz links blieb im Tumor erhalten

D. Die Verknüpfungsstellen innerhalb der PstI-D- Sequenz

52.1(II);59.2.1(V);2.3;4.1;15.4; HeLa 1; pR5,6; rec18, 22, 27, 36, 50

1 [CTGCA]GCGTG CGGCCTGTTT TGTGTATGT TCTTACACGC TTTTACTCAC
 51 TGGCCTGACC ATCCAATGGA TAAAAATCCC ACTATGGACC TACTTACTGG
 101 GGTGCCTAAT TGTATGCTAC AAAGTCCTCA GGTAGTGGGC ACATTGCAAC
 151 GCAATCAGAA TGAATTGTAT AAATTCTTAA ACAATCTGTC CCCTTACTTT
 201 CGTCACAACC GCGAGCGCAT AGAAAAAGCT ACATCTTTTA CTAAAATGCA
 251 AAATGGACTC AAATAAACGT GTACACAATG CATTATAAAT AAAACCATTT
 301 TATTAGCTCA TTGGAGTACA AGCTTGACTG TTTTATTAAA AATCAAATGG
 351 CTCTTCGCGA CAGTCGCCGT GGTGGGTGGG CAGGGATATG TTTCTGFACT
 401 GCAAACGCTG ATGCCACTTG AATTCTGGAA TAACAAGCCT AGGGGGGGAG
 451 CCGTCAAAAT TTTCTCCCA CAGCTGGCGC ACAAGTTGCA GGGCGCCCAT
 501 AACATCAGGA GCAGAAATCT TGAAGTCGCA ATTAGGGCCA GCATTGCCGC
 551 GCGCATTGCG ATAAACTGGA TTTGCGCACT GAAAAACCAA CAAACACGGA
 601 TACTTAATAC TGGCTAACGC TCCAGGGTCG GTTACTTCGT TGATATCAAT
 651 GTTATCCACA TTGCTGAGGT TAAAAGGAGT GATTTTACAC AGTTGACGCC
 701 CCATCCGTGG CAGGCCATCT TGCTTGTTTA AACATTGCA GCGCACTGGC
 751 ATAAGGAGAC GTTTTTGCCC ATGTCGCATG TGAGGGTAGT CGGCCAGCAT
 801 AAAAGCTTCA ATTTGCCTAA AAGCTATTTG AGCCTTCATT CCTTCAGAAT
 851 AAAACAAGCC GCAGGACTTT CCGGAGAAAG AATTATTCCC GCAGCCAACA
 901 TCATGAAAAC AGCAGCGGGC ATCGTCGTTT TTAATTTGAA CTACATTACG
 951 CCCCAGCGG TTTTGCGCCA CCTTGGCTTT CGAGGGGTTT TCTTTCAACG
 1001 CTCGTTGCC ACTTTCGCTG GTTACATCCA TTTCCACCAA ATGCTCTTTG
 1051 CGCACCATCT CCATTCCATG CAGGCATCTA AGCTCCCCTT CGCGCTCGGT
 1101 AACTTATGC TCCCACACGC AGCAACCGGT GGGTTCCCAG GAATTCTGTT Topoll consensus
 1151 GGACACCGGC ATAAGCTTGC ATATATCCTT GCAAAAAGCG TCCCATGAGC
 1201 TCCTGAAAGG TTTTTTGGGA TGAAAAGTC AGCTGCAAAC CGCGCTTTTC
 1251 TTCGTTGAGC CATGTTGTGC ATATTTTCTT GTACACGCTG CCCTGATCCG
 1301 GCAAAAAACG AAAGGTGGCG CGCTCGTCGT GATCCACATG GTACTTTTCC

1351 ATTAGCATAG CCATGGCTTC CATGCCTTTT TCCCAAGCTG AAAGTAGGGG
 1401 CTGGCTTGCC GGATTGCGAA CAACAACAAC ATTCTTTTCA TTTTCGTCGC
 1451 TGTTTTGAGC GGAAGCCTTC AAAACGTGTA CCTGCCTGGT TTCCATTTTT
 1501 TGAAAAGACT GAGAACCCTC TGCATGATGC ATAATGCGGA CGGGCGGCAT
 1551 GCTGAAACCC ATTACTCCTA AAAGTCTCT TGGTGGTTCT GCCTCTTCTT
 1601 CTTCTGCACT CTCTGGGGAA AGAGGTATCG CAGCCATAGA TTTCTTGACT
 1651 TTTTTCTTTG GAGGTAAAGG CACAGCTTCC AGTTCTTCTT CGCTTTTCGA
 1701 ATCCAGAAAG TATCTGCCCA TTTTTGGCGG CGGCGGCTGA GCGCTGCGGT
 1751 CTGGGGTGCG CTCCCTCTGT GAGTGCTGAT TGCTGGCCAT TATTTAATCC
 1801 TAGGCAAAGA AACACATGAT GGATCTGGAG CCACAGGAAA GCTTAACCGC
 1851 CCCCACCGCT CCCGCCATTG GCGCTACGGC TGTCATGGAG AAGGACAAAA
 1901 GTCTACTCAT ACCCCAAGAC GCACCGGTTG AGCAGAACTT GGGCTACGAG
 1951 ACTCCCCCG AGGAATTTGA AGGCTTTCTT CAAATCCAAA AGCAACCAAA
 2001 TGAGCAAAAC GCTGGGCTCG AGGACCATGA CTACCTAAAC GAGGGAGATG
 2051 TCCTGTTTAA ACATCTACAG CGACAAAGCA CTATCGTTTCG CGACGCCATA
 2101 TCTGATCGCT CTTCAATACC AGTTTCAATT GCAGAACTAT CTTGCATCTA
 2151 CGAACGCAAC CTGTTCTCCC CACGTGTGCC CCCTAAACGG CAAGCCAACG
 2201 GCACATGCGA GCCAAATCCT CGCCTTAACT TCTACCCAGT TTTTGCAGTG
 2251 CCAGAAGCAC TGGCAACATA CCATATTTTC TTTAAAAATC ACAAATACC
 2301 CCTATCCTGT CGAGCTAACC GCAGCCGCGC AGATGAGCTT CTTGCTTTAA
 2351 GGGCTGGCGC TTCCATACCT GGGATTGTGT CCTTGGAAGA GGTGCCTAAA
 2401 ATTTTTGAAG GTTTAGGTCG GGATGAAAAA CGAGCAGCAA ATGCCCTGCA
 2451 AAAAGAAAAT GAACAAAATC ACCATGGGAA TAGTGCTCTA ATAGAAGTGG
 2501 AAGGTGACAA TGCCCGCCTG GCAGTTTTAA AGCGCAATAT TGAGGTTACT
 2551 CACTTTGCCT ACCCGGCAGT AAATCTTCCG CCAAAGGTAA TGAGCGCAGT
 2601 GATGAATCAG CTAATAATTA AGCGAGCCCA ACCCATGAC AAAGATGCAA
 2651 ACTTGCAAGA CCCGGAGGCA ACAGATGATG GAAAGCCGGT TGTAAGCGAC
 2701 GAGCAATTAA CTAAGTGGTT GGGAACAGAC AATTCCAACG AACTACAACA
 2751 GCGGCGTAAA CTCATGATGG CCGCCGTACT TGTAAGTGTG GAACTCGAGT
 2801 GCATGCATCG TTTTTTCTCC GACATCACCA CATTGCGCAA AATTGAGGAA
 2851 TGTCTTCACT AACTTTCCG CCATGGCTAC GTGCGCCAAG CCTGTAAAAT

```

2901  TTCTAATGTG GAGCTGAGCA ATCTAGTTTC TTACATGGGC ATCTTGCATG
2951  AAAACCGATT GGGACAGAAC GTGCTACTACT CAACACTACG CGATGAAGCA
3001  CGCAGAGATT ACGTGCGAGA CTGCATTTAC CTTTTCTGT TACATACCTG
                                rec18
3051  GCAAACCTGGG ATGGGTGTTT GGCAGCAATG CTTGGAAGAA AAAAACCTTC
                                ↑○
3101  GAGAACTAAA CAAACTGTTA GACAGAGCAC TAAAATCCCT ATGGACCGGT
3151  TTTGACGAAC GGACAGTAGC TGCAG
                                ↑○○      ↑○○
                                49.42 (II)  15.4
                                59.2.1 (V)   HeLa1

```

zu Anhang D: Die Verknüpfungsstellen des linken Terminus des PstI-D Fragments mit p7pBR322 sind durch schwarze Pfeile dargestellt, die des rechten Endes von p7pBR322 mit PstI-D durch weiße Pfeile. Zur Quelle einzelner Rekombinanten siehe auch Anhang C.

Kurzzusammenfassung

In vorangegangenen Arbeiten ist ein zellfreies System zur Untersuchung der Integration adenoviraler DNA in das Genom der Wirtszelle etabliert worden (Jessberger et al., 1989; Tatzelt et al., 1992, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurden die Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler und Säuger-DNA der *in vitro* Rekombinanten des zellfreien Systems genau analysiert.

Im Verlauf der Reaktion wurde adenovirale DNA durch Interaktion kurzer homologer Sequenzen mit einem Reaktionspartner verknüpft. Dabei bestimmten die terminalen Nukleotidsequenzen der Reaktionspartner den Ort der Rekombination durch homologe Wechselwirkungen mit kurzen Sequenzen innerhalb des Partnermoleküls. Nur in wenigen Rekombinanten bestimmten auch geringfügig vom Terminus verschobene Nukleotidsequenzen den Ort der Rekombination.

Die Verknüpfung der DNA Fragmente war begleitet vom Verlust von Nukleotiden. Das Ausmaß der Deletionen war nicht zufällig, sondern hing von der Lage der interagierenden kurzen Sequenzhomologien ab. In den rekombinanten Molekülen waren die zwischen den interagierenden Sequenzhomologien liegenden Sequenzen und eine der Sequenzhomologien deletiert. Während also von der Nukleotidsequenz des einen Rekombinationspartners stets nur wenige Basenpaare deletiert wurden, konnten im Partner mehrere Kbp deletiert sein. Ununterbrochene kurze Sequenzhomologien wurden häufiger an den Verknüpfungsstellen gefunden als unterbrochene, auch wenn diese zum Teil ausgedehnter waren. Die längsten im zellfreien System beobachteten ununterbrochenen Sequenzhomologien hatten eine Länge von neun Basenpaaren. Bei kurzen Sequenzhomologien mit ähnlicher Anordnung der homologen Nukleotide waren diejenigen Kombinationen begünstigt, die zum geringsten Verlust an Nukleotiden führten. Die beschriebene Aktivität ist nicht nur in Hamsterzellen, sondern auch in menschlichen Zellen nachgewiesen worden. Die Rekombinationsaktivität steht der Ad12 DNA daher sowohl während der abortiven Infektion von Hamsterzellen, als auch während der produktiven Infektion von menschlichen Zellen zur Verfügung.

Die Verknüpfungsstellen der *in vitro* Rekombinanten glichen einigen der Verknüpfungsstellen zwischen adenoviraler und zellulärer DNA aus Ad12-induzierten Tumoren und Ad12-transformierten Zelllinien sehr genau. Ähnlichkeiten und Konsequenzen für die Ad12-Integration in das Wirtszellgenom wurden diskutiert. Die Integration adenoviraler DNA in das Genom der Wirtszelle wurde auch durch kompositionelle Fraktionierung der DNA aus Ad12-induzierten Tumorzellen und Ad12-transformierten Zelllinien untersucht. Die Integration war nicht immer isopyknisch, die Integration erfolgte in diesen Fällen nicht in Isochoren, deren Basenzusammensetzung mit der des Virusgenoms übereinstimmten.

Abstract

A cell free system for the investigation of the integration of adenoviral DNA into the genome of the host cell was established earlier (Jessberger et al., 1989; Tatzelt et al., 1992, 1993). In this report the junction sites between adenoviral and mammalian DNA of the *in vitro* recombinants generated with the cell-free system were analyzed in detail. In the course of the recombination reaction two linear molecules were joined, the reaction took place between two short homologous sequences. One of these short sequence homologies was always at or very close to a DNA terminus, the second short sequence homology could be several kilobasepairs remote from a DNA terminus. Apparently, the nucleotide sequence at the terminus of one molecule determined the point of junction by searching for a short homologous sequence in the partner molecule. The recombination reaction was not conservative, the sequences in-between the short sequence homologies and one of the short sequence homologies were deleted in the *in vitro* recombinants.

Two main criteria influenced the choice of interacting short sequence homologies: perfect homologies of 8-9 bp were most frequently found, they were preferred over more extended, but less perfect homologies. Comparing combinations of short sequence homologies with similar stabilities, those combinations seemed to be chosen which lead to a minimal loss of nucleotides in the recombinants.

The activity was found in hamster and human nuclear extracts, therefore the activity is available for the Ad12 DNA in productively infected human cells and in abortively infected hamster cells.

The junction sites found in the recombinants of the cell-free system were very similar to some junctions between adenoviral and cellular DNA cloned from Ad12-induced tumor cells and Ad12-transformed cell lines. Implications for the integration of Ad12 DNA into the host cell genome are discussed.

The integration of adenovirus DNA into the host genome was also studied by compositional fractionation of DNA from Ad12-induced tumor cells or Ad-transformed cell lines. Integration of Ad12 and Ad2 DNA was frequently found to be not isopycnic, i.e. the sequence composition of the target site did not match the sequence composition of the adenoviral genome.

Lebenslauf

zur Person

Name	Gerd Wronka
Geburtsdatum	4. Juni 1970 in Dorsten
Staatsbürgerschaft	deutsch

Schule

1976-1980	St. Agatha Grundschule/ Dorsten
1980-1989	Gymnasium Petrinum/ Dorsten
Juni 1989	Abitur

Studium

1990-1997	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Mai 1997	Diplom

Berufstätigkeit

1989-1990	Wehrdienst in Wesel und Münster
ab 1998	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Universität zu Köln

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 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 der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Professor Dr. Walter Doerfler betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgenden Titeln publiziert bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Gerd Wronka, Katja Fechteler, Gerd Multhaupt, Konrad Beyreuther and Walter Doerfler, 1998
Integration of adenovirus type 12 DNA into mammalian DNA: mechanism and components of a cell-free system

Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg

G. Wronka, K. Fechteler, B. Schmitz and W. Doerfler, 2000

Integrative recombination between adenovirus type 12 DNA and mammalian DNA

Vortrag auf dem Adenovirus Meeting 2000, Autrans, France

G. Wronka, K. Fechteler, B. Schmitz and W. Doerfler, 2000

Integrative recombination between adenovirus type 12 DNA and mammalian DNA: purification of a cell-free system and analyses of in vitro-generated recombinants

Vortrag auf der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien

G. Wronka, K. Fechteler, B. Schmitz und W. Doerfler, 2002

Integrative Recombination between Adenovirus Type 12 DNA and Mammalian DNA in a Cell-free System: Joining of Short Sequence Homologies

submitted to Virus Research

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Walter Doerfler für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge während der Fertigstellung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, die Möglichkeit zur fachlichen Interaktion mit anderen Wissenschaftlern im eigenen Labor, in der Stazione Zoologica „Anton Dohrn“ und auf verschiedenen Kongressen erhalten zu haben.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Giorgio Bernardi, der mir ermöglicht hat, einige Experimente in der Abteilung „Evoluzione Molecolare“ der Stazione Zoologica in Neapel durchzuführen. Ihm und seinen Mitarbeitern, vor allem Giuseppe Bucciarelli, Giuliana de Luca, Oliver Clay, Nicolas Carels, Romy Sole, Salvatore Bocchetti und Margherita Groeben, möchte ich für ihre warmherzige Gastfreundschaft und stete Hilfsbereitschaft danken.

Knut Müller und Otilia Vieira Breitwieser möchte ich für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, das angenehme Laborklima und für ihre Ratschläge zur Erstellung dieses Manuskripts danken.

Auch bei den anderen Mitarbeitern der 4. Etage möchte ich mich für die meist anregende Zusammenarbeit bedanken.