

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences**

Klonierung der E1-E4-Box des humanen Adenovirus Typ 41

Bachelorarbeit

von:

Aida Bouargoub

Matrnr.: 1879087

Zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt:

Hamburg, den 29. August 2014

Gutachter: Prof. Dr. Paul Scherer (HAW-Hamburg)

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner (Heinrich-Pette-Institut)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Bachelorarbeit unterstützt haben.

Da wäre an erster Stelle Prof. Dr. Thomas Dobner, da er mir die Chance gegeben hat meine Bachelorarbeit in seiner Abteilung zu machen.

Ich möchte mich auch bei Herrn Peter Groitl für die hervorragende fachliche Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken.

Seitens der Hochschule danke ich meinem Betreuer Prof. Dr. Paul Scherer für sein Interesse an diesem Thema sowie auch für seine hilfreichen Ratschläge.

Des Weiteren sei den Mitarbeitern der Abteilung Virale Transformation für ein stets angenehmes Arbeitsklima gedankt.

Ein großer Dank geht auch an meine Familie und meine Freunde für die moralische Unterstützung und für die Geduld, die sie für mich aufgebracht haben.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Klassifizierung.....	1
1.2 Pathogenese.....	2
1.3 Struktur und Genom	3
1.4 Produktiver Infektionszyklus.....	5
1.5 Vektoren.....	7
1.5.1 <i>Gentherapie</i>	7
1.6 Aufgabenstellung.....	8
2 Material	10
2.1 Bakterien und Zelllinien.....	10
2.1.1 <i>Bakterien</i>	10
3.1.2 <i>Säugerzellen</i>	10
2.2 Nukleinsäuren.....	11
2.2.1 <i>Primer</i>	11
2.2.2 <i>Vektoren</i>	11
2.2.3 <i>Rekombinante Plasmide</i>	12
2.3 Adenoviren.....	12
2.4 Enzyme	12
2.4.1 <i>Restriktionsenzyme</i>	12
2.4.2 <i>Enzyme</i>	13
2.5 Kommerzielle Systeme.....	13
2.6 Chemikalien und Reagenzien	14
2.7 Puffer und Lösungen	15

2.8	Verbrauchsgegenstände.....	16
2.9	Geräte	16
3	Methoden	18
3.1	Bakterien	18
3.1.1	<i>Kulturbedingungen und Lagerung</i>	<i>18</i>
3.1.2	<i>Transformation von E.coli.....</i>	<i>18</i>
3.2	Säugetierzellen	19
3.2.1	<i>Kultivierung und Passage.....</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Lagerung</i>	<i>19</i>
3.2.3	<i>Bestimmung der Lebendzellzahl.....</i>	<i>20</i>
3.3	Adenoviren	20
3.3.1	<i>Infektion.....</i>	<i>20</i>
3.3.2	<i>Herstellung eines hochtitrigen Virusstocks.....</i>	<i>21</i>
3.3.3	<i>Aufreinigung von Adenoviren mittels CsCl-Gradienten.....</i>	<i>21</i>
3.4	DNA-Techniken.....	22
3.4.1	<i>Isolation viraler DNA aus Viruspartikeln.....</i>	<i>22</i>
3.4.2	<i>Präparation von Plasmid-DNA.....</i>	<i>22</i>
3.4.3	<i>DNA-Fällung.....</i>	<i>23</i>
3.4.4	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA.....</i>	<i>23</i>
3.4.5	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	<i>23</i>
3.4.6	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	<i>24</i>
3.4.7	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion.....</i>	<i>25</i>
3.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	26
3.5.1	<i>Restriktionsspaltung.....</i>	<i>26</i>
3.5.2	<i>Ligation</i>	<i>27</i>
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Herstellung der HAdV41 E1-E4-Box	29

4.1.1	<i>Gewinnung von HAdV41 Virus-DNA</i>	29
4.1.2	<i>Konstruktion HAdV41 E1-E4-Box</i>	29
4.1.3	<i>Generierung des Vektors pPG-SfiI</i>	29
4.1.4	<i>Amplifikation des linken und des rechten Genomendes</i>	31
4.1.5	<i>Herstellung der kombinierten E1-E4-Box</i>	32
4.1.6	<i>Generierung der einzelnen E1-Box und E4-Box Plasmide</i>	34
4.1.7	<i>Vervollständigung des HAdV41-Bacmids</i>	36
5	Diskussion	38
5.1	Das Klonierungssystem HAdV41	38
5.1.1	<i>Gewinnung von Virus-DNA</i>	38
5.1.2	<i>Herstellung des HAdV41 Klonierungssystem</i>	39
5.2	Ausblick.....	40
6	Zusammenfassung	42
7	Literaturverzeichnis	43
8	Anhang	48

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
DMEM	Dulbecco's Modified-Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötale Kälberserum
HAdV	Humaner Adenovirus
HEPES	2-Ethansulfonsäure
Kbp	Kilobasenpaare
LB-Medium	<i>Luria-Broth-Medium</i>
NaOAc	Natriumazetat
nt	Nukleotide
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TP	Terminales Protein
ÜN	über Nacht
UpM/rpm	Umdrehung pro Minute/ <i>rounds per minute</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil pro Gesamtvolumen

1 Einleitung

1.1 Klassifizierung

Adenoviren wurden 1953 zum ersten Mal aus Tonsillen isoliert (Hilleman und Werner, 1954; Rowe et al., 1953). Seit dieser Zeit wurden mehr als 100 Typen isoliert und in fünf Genera unterteilt: Mastadenoviren, Aviadenoviren, Atadenoviren, Siadenoviren und Ichtadenoviren. Die meisten Subtypen gehören zu den Mastadenoviren (Säugetiere) und den Aviadenoviren (Vögel). Atadenoviren werden in Säugetieren und Vögel gefunden, Siadenoviren in Amphibien und Vögeln. Zuletzt wurden auch in einem Fisch, dem Stör, Adenoviren nachgewiesen und eine neue Gattung Ichtadenoviren (Benkó et al., 2002; Davison et al., 2003) definiert.

Tabelle 1: Klassifizierung. Zusammenfassung aller bekannten Genera der Familie der *Adenoviridae*

Gattung	Wirt
Mastadenoviren	Säugetiere
Aviadenoviren	Vögel
Atadenoviren	Säugetiere, Vögel
Siadenoviren	Vögel, Amphibien
Ichtadenoviren	Stör

Die humanen Adenoviren gehören zu der Gattung der Mastadenoviren. Sie werden in sieben Spezies A-G unterteilt und umfassen derzeit 67 Typen. Diese Unterteilung beruht auf DNA-Sequenzhomologien, Hämagglutinationseigenschaften und der Einteilung ihres onkogenen Potentials im Nagetier (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2.: Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren in Nagetieren

Sub-genus	Virustypen	Zielorgane	Tumorbildung in Nagetieren	Zelltransformation	DNA-Homologie (im Subgenus)
A	Ad12, 18, 31	Gastrointestinalbereich	Hoch	Ja	48-69%
B	Ad3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Lunge, Pharynx, Bindehaut	Mittel	Ja	89-94%
C	Ad1, 2, 5, 6	Pharynx	Niedrig	Ja	99-100%
D	Ad8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47, 29, 51	Bindehaut	Sehr niedrig	Ja	94-99%
E	Ad4	Respirationstrakt	Sehr niedrig	Ja	-
F	Ad40 ,41	Gastrointestinalbereich	Unbekannt	Ja	62-69%
G	Ad52	-	Unbekannt	-	-

1.2 Pathogenese

Humane Adenoviren (HAdV) sind weltweit verbreitet und können sowohl lytische als auch persistierende Infektionen auslösen. Die Symptome sind unterschiedlich und variieren in Abhängigkeit der jeweiligen Spezies. Am häufigsten treten Erkrankungen der Atemwege, der Augen und des Gastrointestinaltraktes auf. Bei gesunden Erwachsenen verlaufen Infektionen mit HAdV meist milde und ohne schwere Symptome. Bei immunsupprimierten Menschen dagegen führt eine Infektion häufig zu schweren, manchmal sogar letalen Erkrankungen wie z.B. Enzephalitis, Pneumonien oder multiplem Organversagen (Berk, 2007; Wold und Horwitz, 2007).

Säuglinge und Kleinkinder infizieren sich häufig mit HAdV, die bevorzugt den Gastrointestinaltrakt befallen. Dabei handelt es sich meistens um HAdV40 und 41 (Uhnoo, 1984) die man in Stuhlproben nachweisen kann.

1.3 Struktur und Genom

Adenovirus-Partikel bestehen aus einem unbehüllten ikosaedrischen Kapsid und haben einen Durchmesser von 80-100nm. Es sind DNA-Viren mit einem linearen, doppelsträngigen Genom der Größe von 26-45 kbp (Berk, 2007).

Das Kapsid besteht aus 252 Kapsomeren, wobei die Flächen von den 240 Hexonproteinen gebildet werden und die 12 Kanten ein Pentonprotein tragen.

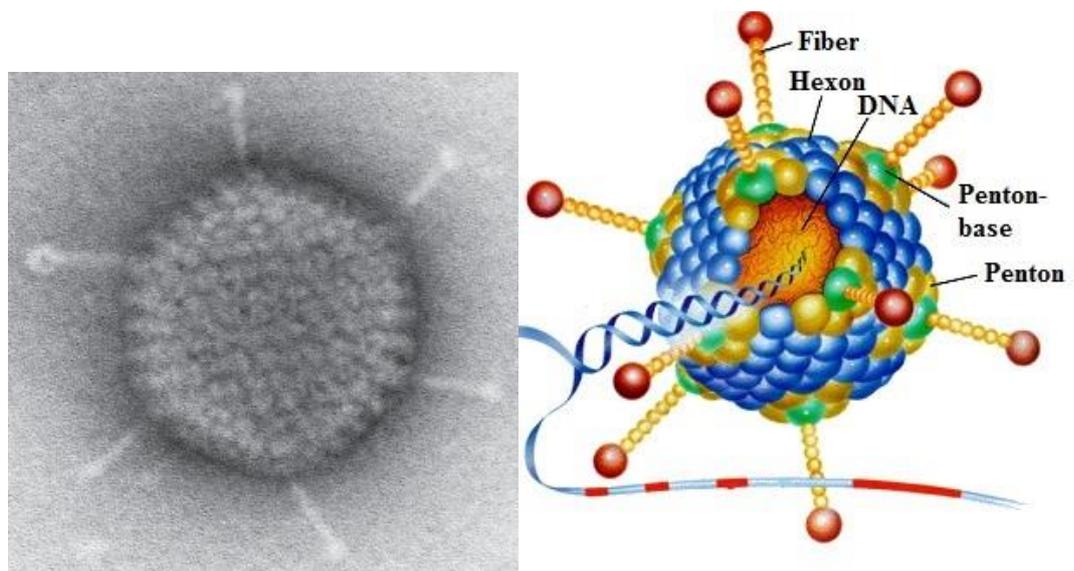


Abbildung 1. Struktur des adenoviralen Virions. Links: Die elektronenmikroskopische Darstellung zeigt das ikosaedrische Adenovirus-Kapsid mit hervorstehenden Fiber-Proteinen. Rechts: In der graphischen Abbildung wird eine allgemeine Darstellung eines Adenovirus Partikel gezeigt (modifiziert nach Martin, M. et al., 2007).

Die Pentonproteine bestehen aus dem Pentonbasisprotein und dem Fiberprotein. Die meisten HAdV besitzen nur eine Art von Fiberprotein. Einzige Ausnahme ist die Spezies F. Deren Vertreter tragen alternierend kurze und lange Fiberproteine an den Kanten (Thiemessen und Kidd, 1995). Das Fiberprotein besteht aus einem trimeren Proteinkomplex der in *tail*, *shaft* und *knob* gegliedert ist. Dabei stellt der *tail*-Abschnitt die Verbindung mit dem Pentonbasisprotein her, den *shaft*, dessen Länge unter den

Einleitung

verschiedenen Subtypen stark variiert. Die *knob* – Domäne vermittelt den Kontakt mit den Rezeptoren der Zielzellen (Wu et al., 2003).

Auch andere Proteine sind am Aufbau des Kapsids beteiligt. So spielen z.B. die Proteine VI und IIIa bei der Kapsid Assemblierung und Deassemblierung eine entscheidende Rolle (Wiethoff et al., 2003; Stewart et al., 1993). Im Kapsid bildet das adenovirale Genom in Assoziation mit den basischen Virusproteinen V, VII und μ einen Nukleoproteinkomplex (Core). Die dsDNA ist an den 5'Enden über eine Phosphodiesterbindung kovalent mit dem terminalen Protein (TP) verknüpft. Dessen Vorläuferprotein dient bei der Initiation der DNA-Replikation als Protein-Primer. Das Genom ist an beiden Enden von invertierten terminalen Wiederholungseinheiten (*inverted terminal repeats*, ITRs) flankiert, deren Länge zwischen 36-200bp variiert und als Replikationsursprung für die DNA-Synthese fungiert (Berk, 2007).

Der größte Teil des Genoms kodiert virale Strukturproteine, Proteine der viralen DNA-Replikation und Proteine des Viruszusammenbaus. Der Genomaufbau ist bei allen Genera zu einem gewissen Grad konserviert.

Die frühen Proteine der E1-, E3- und E4-Region sowie die virusassoziierten RNAs (VA RNAs) gibt es nur bei den Mitgliedern der Mastadenoviren (Davison et al., 2003).

Die Genome der humanen Adenoviren sind gleich strukturiert. Sie bestehen aus neun Transkriptionseinheiten und enthalten etwa 40 verschiedene Regulations- und Strukturproteine und kodieren ein bis zwei VA RNAs. Fast alle mRNAs unterliegen alternativen Splicing-Prozessen (Berk, 2007).

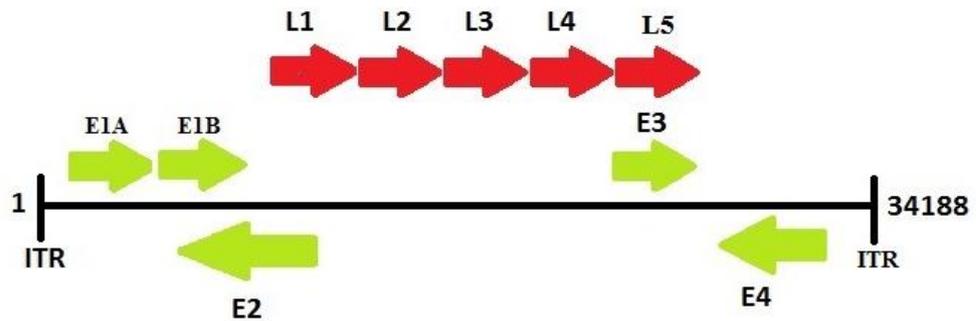


Abbildung 2: Genomorganisation am Beispiel des HAdV41: Die Pfeile symbolisieren die Lage und die Transkriptionsrichtungen der frühen (E1A, E1B, E2, E3 und E4) und der späten Transkriptionseinheiten (L1-L5).

1.4 Produktiver Infektionszyklus

Der Infektionszyklus der HAdV ist in eine frühe und eine späte Phase eingeteilt. Per Konvention werden diese durch das Einsetzen der DNA-Replikation getrennt (Berk, 2007). Die frühe Phase beginnt mit der Verbindung der Fiber *knob*-Domäne mit dem zellulären Coxsackie-Adenovirus Rezeptor (CAR). Die Interaktion des Pentonbasisproteins mit auf der Zelloberfläche vorhandenen Integrinen ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$) über ein konservierte Arginin-Glycin-Aspartat (RGD-) Motiv induziert die Rezeptor vermittelte Endozytose (Roelvink et al., 1998; Berk, 2007). Nur die Vertreter der Spezies F unterscheiden sich hier von den anderen HAdVs: HAdV 40 besitzt statt dem RGD ein Arginin-Glycin-Alanin-Aspartat (RGAD-) Motiv und HAdV41 ein Isoleucin-Glycin-Aspartat-Aspartat (IGDD-) Motiv. Es wird angenommen, dass diese Veränderung der Grund für die geringe Infektionseffizienz der F- Typen ist (Albinsson und Kidd, 1999).

Durch die Expression des Proteins pVI induziert das HAdV das Aufbrechen des Endosoms bevor das teilweise disassemblierte Viruspartikel ins Zytoplasma entlassen

wird. Diese werden anschließend durch den Dynein-Motor entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Greber et al., 1993). Nur die DNA und die *Core*-Proteine gelangen über die Kernpore in den Zellkern der infizierten Zelle, wo die Transkription der frühen viralen Gene stattfindet.

Die Expression der frühen viralen Proteine stellen die optimalen Bedingungen für die folgende DNA-Replikation und die Synthese der viralen Strukturproteine in der späten Phase der Replikation her. Die Proteine, die in der E1A-Region kodieren werden zuerst exprimiert (Nevins et al., 1979) und aktivieren die Transkription der anderen frühen Virusgene. Außerdem leiten sie den Übergang der G₀-Zelle in die S-Phase ein (Berk, 2007). Die E1B-Transkriptionseinheit kodiert verschiedene Proteine. Dabei ist E1B-19K ein BCL2 analoges Protein, das die zelleigenen Faktoren BAK und BAX bindet und somit die Ausschüttung der proapoptotischen Signale aus den Mitochondrien verhindert (Cuconati und White, 2002). Das E1B-55K besitzt ebenso antiapoptotische Kapazitäten und inhibiert gezielt die Funktionen des zellulären Tumorsuppressors p53 sowie den proapoptotischen Transkriptionsfaktor Daxx. Die E2-Transkriptionseinheit kodiert für drei virale Proteine: die DNA-Polymerase, die für die Virus-Replikation benötigt wird, das Einzelstrang-DNA-bindende Protein (DBP) und das Terminale Protein TP, welches bei der Initiation der DNA-Synthese eine Rolle spielt (Berk, 2007). Die E4-Transkriptionseinheit kodiert verschiedene Genprodukte, die bei der Regulation der Transkription, der Translation, der Apoptose und der DNA-Replikation von Bedeutung sind (Täuber und Dobner, 2001).

Nach dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation werden die Proteine der späten Transkriptionseinheit exprimiert. Die meisten in diesem Bereich kodierten Proteine sind Strukturproteine des Kapsids (Hexon, Fiber, Penton) oder nehmen katalytische

Funktionen bei der Assemblierung des Kapsids wahr. Nach der Reifung der Viruspartikel zu infektiösen Virionen kommt es zur deren Freisetzung in (Berk, 2007).

1.5 Vektoren

1.5.1 Gentherapie

Adenoviren sind heutzutage die meistverwendeten Vektoren; sowohl in der Zell- und Gewebekultur, als auch in der Gentherapie. Die Adenoviren haben viele Vorteile in der Gentherapie. Sie können ein breites Spektrum unterschiedlichster, bereits ausdifferenzierter Zellen infizieren. Ein weiterer Vorteil ist, dass Adenoviren, im Gegensatz zu anderen viralen Vektorsystemen wie z. B. Lentiviren, leicht in Zellkultur vermehrt werden können.

Die meisten Vektoren, die bei der Gentherapie verwendet werden, sind von Adenoviren der Subtypen HAdV5 und 2 abgeleitet. Sie können bis zu 37 kb Fremdgene aufnehmen und werden selten in das Wirtsgenom integriert. Diese Vektoren wurden am Anfang durch Deletion der E1- und der E3-Region des Genoms hergestellt und somit Raum für die zu exprimierenden Fremdgene geschaffen (Danthinne und Imperiale, 2000). Trotz der Deletion der anderen Transkriptionseinheiten transaktivierenden E1A-Gens wurden durch die Basalaktivität deren Promotoren in der Zelle immer noch unerwünschter Weise geringe Mengen viraler Proteine gebildet. Deswegen wurden auch andere kodierende Bereiche des adenviralen Genoms nacheinander deletiert. Die bislang letzte Stufe der Entwicklung ist die Generierung von helferabhängigen bzw. „*high capacity*“ oder „*gutless*“ Vektoren. Diese Vektoren enthalten nur noch den Replikationsursprung (ITR) und das Signal für die Verpackung des Genoms in das Viruspartikel (Volpers und Kochanek, 2004).

Ein Nachteil der von HAdV5 oder 2 abgeleiteten adenoviralen Vektoren für den Einsatz in der Gentherapie liegt in der hohen typspezifischen Immunität in der Bevölkerung. Die Immunantwort wird primär durch die viralen Kapsidproteine (Liu und Murve, 2003) und durch Aufnahme viraler Partikel in die Kupferzellen der Leber ausgelöst (Lieber et al., 1997). Lösungsansätze sind die Maskierung von immunogenen Kapsidproteinen, die Verwendung von alternativen Subtypen als Vektoren oder die Generierung von Hybridviren als Vektoren. Im Jahr 2003 wurden in China replikationsdefiziente adenovirale Vektoren für die Gentherapie erstmalig zugelassen (Peng, 2005).

1.6 Aufgabenstellung

Basierend auf einem direkten Klonierungssystem zur Generierung von replikationskompetenten humanen Adenoviren (HAdV), konnten kürzlich die Klonierungskassetten für die Typen 5, 12, 50 und 36 etabliert und validiert werden. Diese Viren, Vertreter der Spezies A, B, C und D können zukünftig einfach und zeitnah auf genetischer Ebene verändert werden, um anschließend phänotypische Charakterisierungen durchzuführen und spezifische Fragestellungen genau zu beleuchten. Vertreter der Spezies F (HAdV40 und HAdV41) sind klinisch sehr relevant, da sie eine der Hauptursachen für oftmals letale Gastroenteritis Erkrankungen bei Kindern (Uhoo et al., 1984), vor allem außerhalb der Industrieländer (Sidri-Loulizi et al., 2009; Kamel et al., 2009), darstellen. Ihr breit gefächertes Infektionsspektrum verschiedener humaner Zelltypen macht sie für eine Anwendung in der Gentherapie als Vektoren interessant. Dabei zeichnet sich diese Adenovirusspezies vor allem auch durch zwei verschiedenen große Fiberproteine auf dem viralen Kapsid aus.

Einleitung

Es ist von großem gesellschaftlichem Nutzen das virale Genom von HAdV41 in den Kontext eines bakteriellen Plasmids zu klonieren, um erstmalig weiterführende Manipulationen auf genetischer Ebene durchführen zu können (Generierung von Virusmutanten, Einführung von Expressionskassetten etc.) und demnach Rückschlüsse auf die einzigartige Biologie dieses pathogenen Erregers zu ziehen. Ziel dieser Arbeit war es, HAdV41 in Zellkultur zu vermehren, die DNA aus den gereinigten Viruspartikeln zu isolieren und möglichst umfangreiche Teile des viralen Genoms in einen geeigneten Vektor zu klonieren.

2 Material

In diesem Abschnitt sind alle verwendeten Geräte, Materialien und Chemikalien aufgeführt.

2.1 Bakterien und Zelllinien

2.1.1 Bakterien

Die folgenden *E.coli* Stämme wurden verwendet.

Tabelle 3: Übersicht zu den verwendeten Bakterienstämmen

Bezeichnung	Genotyp
XL2-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacIqZ_M15, Tn10 (Tetr), Amy, Camr] (Stratagene, La Jolla, CA, USA; Bullock et al., 1987)
DH5 α	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, _lacU169, (_80dlacZ_M15) (Hanahan, 1983)

3.1.2 Säugerzellen

Tabelle 4: Übersicht zu den verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
H1299	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie p53-negativ (Mitsudomi et al., 1992)
A549	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie (Giard et al., 1973)
HEK 293	menschliche embryonale Nierenzelllinie, stabil transformiert mit der HAdV E1 Transkriptionseinheit (E1A und E1B, etwa 4,5 KB) (Graham et al., 1977))

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Primer

In der nächsten Tabelle sind die Oligonukleotide aufgeführt, die für die PCR-Amplifikation der DNA Fragmente und die Herstellung der benötigten Vektoren verwendet wurden. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion hergestellt. In der ersten Spalte steht die Nummer der abteilungseigenen Labordatenbank.

Tabelle 5: Übersicht zu den verwendeten Oligonuklotiden

#	Bezeichnung	5'-3'-Sequenz	Verwendung
2418	pPG-Ad41fwd	GGGTTTAAACCCGGATCCACTG GCCTAATTGGCCGATCCAATTC TTGAAGACG	Vektor pPG-SfiI
2419	pPG-Ad41rev	CGTCTTCAAGAATTGGATCGGC CAATTAGGCCAGTGGATCCGGG TTTAAACCC	Vektor pPG-SfiI
2420	Ad41 ITR	ATAGTTAAACCATCATCATCAA TAATATACCTTAAAGCTGGAAA CGAGCC	Amplifikation
2421	Ad41 E1rev	ATAACGCGTGCTGTGGCAAGCG TTCCTTGCTGC	Amplifikation
2422	Ad41 E4fwd	ATAACGCGTGGTCTCAGGGAAC TTCTCCCC	Amplifikation

2.2.2 Vektoren

Für die Klonierung der in Tabelle 6 aufgeführten Plasmide wurde der Vektor pPG-SfiI hergestellt, der vom schon existierenden Vektor pPG-S5 abgeleitet ist. Dieser Vektor trägt eine Ampicillin-Resistenz.

2.2.3 Rekombinante Plasmide

In der folgenden Tabelle werden die während der Bachelor-Arbeit hergestellten Plasmide aufgeführt. In der ersten Spalte steht die Nummer die das Plasmid in der abteilungseigenen Labordatenbank hat.

Tabelle 6: Übersicht zu den generierten Plasmiden

#	Bezeichnung	Beschreibung
2672	Ad41 E1-E4-Box	HAdV41 E1- und E4-Transkriptionsbereich
0249	pPG-SfiI	Vektor zur Herstellung der E1-E4-Box
0250	pPG-PmeI	Vektor zur Herstellung des HAdV41-Bacmids

2.3 Adenoviren

Tabelle 7: Verwendete Virusstämme

Bezeichnung	Beschreibung
Ad 41 WT	HAdV41, Wildtypstamm (diese Arbeit)

2.4 Enzyme

2.4.1 Restriktionsenzyme

Tabelle 8: Übersicht zu den verwendeten Restriktionsenzymen

		Sequenz
MluI	Micrococcus luteus	A/CGCGT
PmeI	Pseudomonas medocina	CAC/GTG
SfiI	Streptomyces fimbriatus	GGCCNNNN/NGGCC
PacI	Pseudomonas alicigenes	TTAAT/TAA
AsiSI	Arthrobacter species	GCGAT/CGC

2.4.2 Enzyme

Tabelle 9: Übersicht zu den verwendeten Enzymen

Enzyme	Beschreibung
<i>Pfu-UltraTM II Fusion HS</i> DNA Polymerase	<i>Stratagene</i> , La Jolla
Antarktische Phosphatase	<i>New England Biolabs</i> , Beverly
Proteinase K	<i>Abcam</i> , Cambridge
Ribonuklease T1	<i>Roche AG</i> , Basel

2.5 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet.

Tabelle 10: Übersicht zu den kommerziellen Systemen

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Plasmid Mini/Tip20/ Maxi-Kit	Plasmidpräparationen	<i>QIAGEN</i> , Hilden
1kb DNA-Ladder	Größe- und Molekulargewichtsstandard	<i>New England Biolabs</i> , Beverly

2.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11: Übersicht zu den verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Herkunft
Ampicillin	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
β -Mercaptoethanol	<i>Stratagene</i> , La Jolla, CA (USA)
Bacto Agar	<i>Bacto Dickinson</i> , Fraklin Lak, NY (USA)
Bacto Trypton	<i>Bacto Dickinson</i> , Fraklin Lak, NY (USA)
Bromphenolblau	<i>Merck</i> , Darmstadt
Borsäure	<i>Merck</i> , Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	<i>New England Biolabs</i> , Beverly, MA (USA)
Dimethylsulfoxid(DMSO)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Deisenhofen
dNTPs	<i>New England Biolabs</i> , Beverly, MA (USA)
Ethidiumbromid	<i>Sigma-Aldrich</i> , Deisenhofen
Glyzin	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
Guanosin	<i>Sigma-Aldrich</i> , Deisenhofen
Hefeextrakt	<i>Bacto Dickinson</i> , Fraklin Lak, NY (USA)
LE Agarose	<i>Biozym</i> , Hessisch Oldendorf
Penicillin/Streptomycin (100x)	<i>PAA</i> , Pasching (Österreich)
TEMED	<i>AppliChem</i> , Darmstadt
Titriplex III (EDTA)	<i>Merck</i> , Darmstadt
Trypanblau	<i>Merck</i> , Darmstadt
Trypsin/EDTA	<i>PAA</i> , Pasching (Österreich)
<i>Tween 20</i>	<i>Merck</i> , Darmstadt

2.7 Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus einer „Millipore“ - Anlage (Millipore, Billerica, MA, USA) angesetzt.

6x DNA-Auftragspuffer

Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Saccharose	40% (v/v)
5x TBE	20% (v/v)

HEPES-Puffer (pH 7.9)

HEPES	100mM
-------	-------

LB-Medium

Trypton	10g/l
Hefeextrakt	5g/l
NaCl	5g/l

LB-Glycerin

LB-Medium	50% (v/v)
Glyzerin (87%)	50% (v/v)

PBS (pH 7.35)

NaCl	140mM
KCl	3mM
Na ₂ HPO ₄	4mM

5x TBE

Tris	0,45 M
Bromsäure	0,45 M
EDTA	10mM

TBS-BG

Tris/HCl (pH 7.6)	20mM
NaCl	137mM
HCl	3mM
MgCl ₂	105mM
Tween 20	0,05% (v/v)
NaN ₃	0,05% (w/v)
Glyzin	5 mg/ml
BSA	5 mg/ml

Trypanblau-Lösung

Trypanblau	0,15% (w/v)
NaCl	0,85% (w/v)

Puffer P1

Tris/HCl (pH 8.0)	50mM
EDTA	10mM
RNase A	100 µg/ml

Puffer P2

NaOH	200mM
SDS	1% (w/v)

Puffer P3 (pH 5.5)

Caliumacetat	3.0M
--------------	------

2.8 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Verbrauchsgegenstände

Gegenstände	Hersteller
Einfrierröhrchen	<i>Sarstedt</i> , Nürnberg
Einmal-Impfösen	<i>Greiner</i> , Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1.5ml ; 2ml)	<i>Sarstedt</i> , Nürnberg
PCR-Reaktionsgefäß	<i>Biozym</i> , Hessisch Oldendorf
Petrischalen	VWR, Hannover
<i>Phase Lock</i> -Röhrchen (2ml ; 15ml)	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Pipettenspitze	<i>Sarstedt</i> , Nürnberg
PP-Röhrchen (15ml ; 50ml)	<i>Sarstedt</i> , Nürnberg
6-well-Zellkulturplatten	<i>Sarstedt</i> , Nürnberg
150mm-100mm-Zellkulturschalen	<i>Sarstedt</i> , Nürnberg
Zellschaber (25cm; 39cm)	<i>Sarstedt</i> , Nürnberg
<i>Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette</i>	<i>Thermo Scientific</i> , Waltham, MA (USA)

2.9 Geräte

Tabelle 13: Übersicht zu den verwendeten Geräten

Geräte	Hersteller
Bakterieninkubator	<i>Heraeus Instruments</i> , Hanau
Durchlichtmikroskop DMIL	<i>Leica Mikrosysteme</i> , Wetzlar
Gelkammer GNA 200	<i>Pharmacia Biotech</i> , Uppsala (Schweden)
Gelkammer <i>Multigel</i>	<i>Biometra</i> , Göttingen
Heizblock <i>Thermomixer comfort</i>	<i>Eppendorf</i> , Hamburg
Neubauer-Zählkammer	<i>Roth AG</i> , Karlsruhe
PCR-Gerät <i>FlexCycler</i>	<i>Analytik. Jena</i> , Jena
Photometer <i>SmartSpecTM Plus</i>	<i>Bio-Rad</i> , München
Pipetten (10µl-1000µl)	<i>Gilson</i> , Villers le Bel (Frankreich)

Material

Pipettierhilfe <i>Pipetboy</i>	<i>IBS, Fernwald</i>
Reaktionsgefäßschüttler Mixer 5432	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Säugerzelleninkubator BRD 6220	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Stickstoffbehälter	<i>KGW-Isotherm, Hanau</i>
Schüttler 3016	<i>GFL, Burgwedel</i>
Überkopfschüttler 3025	<i>GFL, Burgwedel</i>
UV-Geldokumentator <i>G:Box</i>	<i>Syngene, Cambridge (UK)</i>
UV-Schirm GVM20	<i>Syngene, Cambridge (UK)</i>
Vakuumpzentrifuge SPD111V	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)</i>
Vortexer VF2	<i>IKA, Staufen</i>
Vortexer MS3 <i>basic</i>	<i>IKA, Staufen</i>
Waage FX-3000i	<i>AND A&D Company Limited, Tokyo (Japan)</i>
Wasserbad V3	<i>Julabo, Seelbach</i>
Wasserbad 1083	<i>GFL, Burgwedel</i>
Zentrifuge <i>Biofuge13</i>	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Zentrifuge <i>Centrifuge 5415C</i>	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Zentrifuge <i>Galaxy Mini</i>	<i>VWR, Hannover</i>
Zentrifuge <i>Centrifuge 5417R</i>	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Zentrifuge <i>Sorvall Super T21</i>	<i>Thermo Scientific, Waltham, MA (USA)</i>
Zentrifuge <i>Megafuge 1,0</i>	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Zentrifuge <i>Multifuge 3S-R</i>	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>

3 Methoden

3.1 Bakterien

3.1.1 Kulturbedingungen und Lagerung

Flüssigkulturen. Für die Anzucht der Bakterien in Flüssigkultur wurde steriles LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin versetzt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Diese wird ÜN bei 30°/37°C und 220UpM in der Schütteltruhe inkubiert.

Plattenkulturen. Mit einer sterilen Impföse wurden aus einer Glycerinkultur Bakterien entnommen und ein Reinigungsausstrich auf einer LB-Agarplatte durchgeführt, um nach einer Übernachtinkubation Einzelkolonien zu erhalten. Die Platten können mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Glycerinkulturen. Flüssigkulturen wurden vor Erreichung der stationären Phase abzentrifugiert (4000rpm, 5min), in 1ml Glycerin/LB-Medium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Dauerkulturen wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.1.2 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von PCR-Produkten wurden DH5α Stämme verwendet. Bei der Transformation von Ligationsprodukten, wurden ultakompetente *XL2-blue* verwendet.

In eisgekühlten Polypropylen-Röhrchen wurden die Bakterien (DH5α: 100µl, XL2-Blue: ca. 130µl) mit 10µl bzw. 20µl des Ligationsansatzes und 1 bzw. 2µl β-Mercaptoethanol (1.22 M) zusammengefügt und 30min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock für 45sec bei 42°C durchgeführt. Als nächstes wurde der Transformationsansatz mit 1ml LB-Medium versetzt und für 1h bei 37°C und 220 UpM

inkubiert. Zuletzt wurden die transformierten Bakterien auf mehreren LB-Agar-Platten mit 100µg/ml Ampicillin ausplattiert und bei 37°C für 16-20h inkubiert.

3.2 Säugetierzellen

3.2.1 Kultivierung und Passage

Die Zelllinien HEK 293, A549, H1299 wurden in 150mm-Zellkulturschalen kultiviert.

Dafür wurde als Nährmedium DMEM (Dulbecco und Freeman, 1959) mit 5-10% Fötalem Kälberserum (FKS) oder Neugeborenem Kälberserum (NKS) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt.

Die Zellkulturschalen wurden bei 37°C und in einer 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert sowie nach 2-5 Tagen (je nach Zelldichte) im Verhältnis 1/2-1/10 passagiert.

Dafür wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturgefäß abgelöst (37°C, 3-5 min). Nach Zugabe von frischem Medium wurden die abgelösten Zellen abzentrifugiert (2500rpm, 3min) und in einem geeigneten Volumen des Mediums resuspendiert.

3.2.2 Lagerung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen, wie in 4.2.1. beschrieben, trypsinisiert und nach Ablösung zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900µl FKS und 100µl DMSO resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt sowie sofort bei -80°C weggefroren.

Bei der Reaktivierung wurden die Zellen bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und auf eine 150mm-Schale mit vorgelegtem Medium gegeben.

3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzählung wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellen wurden wie bei 4.2.1. trypsiniert, zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen des Mediums resuspendiert. Um die Zellen besser sichtbar zu machen, wurde eine 1:2 Verdünnung mit Trypanblau hergestellt. Die Membran lebender Zellen ist impermeabel für Trypanblau, während tote Zellen den Farbstoff aufnehmen. Die Zellzahl ergibt sich aus dem Mittelwert von zwei großen Quadraten und dem Multiplikationsfaktor $2 \cdot 10^4$.

3.3 Adenoviren

3.3.1 Infektion

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien HEK 293, H1299 und A549 zum Propagieren von Viren verwendet.

Die zu infizierenden Zellen wurden so ausgesät, dass sie am nächsten Tag etwa 60-80% der Fläche der Kulturschale besiedelten. Eine entsprechende Menge an Virus wurde mit einem geeigneten Volumen DMEM gemischt und auf die Zellen gegeben (150mm-Schale: 9ml; 100mm-Schale: 5ml; 60mm-Schale: 2ml). Die Zellen wurden für zwei Stunden bei 37°C alle 15min geschwenkt um eine gleichmäßige Infektion zu gewährleisten. Danach wurden die Kulturschalen mit Medium (10% FKS) versetzt (150mm-Schale: 25ml; 100mm-Schale: 10ml; 60mm-Schale: 5ml) und ÜN im Zellkulturschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

Die infizierten Zellen wurden inkubiert bis ein zytopathischer Effekt sichtbar wurde.

Die Zellen wurden wie bei 3.2.1. trypsiniert und abzentrifugiert und in 3ml (5ml) DMEM ohne FKS und Antibiotika aufgenommen. Durch drei Zyklen Einfrieren in

Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad lysiert die Zellmembran und die Viruspartikel werden aus der Zelle befreit.

3.3.2 Herstellung eines hochtitrigen Virusstocks

Zur Vermehrung von Viren werden drei bis vier aufeinanderfolgende Infektionen durchgeführt und abhängig vom phänotypischen Erscheinungsbild der Zellen etwa nach 10 Tagen geerntet (3.3.1). Für die Gewinnung eines hochtitrigen Virusstocks wurden 10x150mm-Schalen infiziert und erneut nach ca. zehn Tagen geerntet, lysiert (3.3.1) und weiterbearbeitet.

3.3.3 Aufreinigung von Adenoviren mittels CsCl-Gradienten

Die geernteten Zellen wurden in HEPES-Lösung aufgenommen und wie bei 3.3.1. beschrieben aufgebrochen und zentrifugiert (4500rpm, 10min). Der Überstand wurde abgenommen und noch mal zentrifugiert. Von diesem Überstand werden Viruspartikel durch einen CsCl-Gradienten isoliert. Dafür wurde ein Zentrifugenröhrchen mit zwei verschiedenen schweren CsCl-Lösungen gefüllt.

Die leichtere Lösung ($\rho=1,25\text{g/cm}^3$) wurde mit der schweren Lösung ($\rho=1,40\text{g/cm}^3$) unterschichtet und die Trennlinie markiert. Es wurden ca. 8ml der Virussuspension vorsichtig auf den Gradienten gegeben um eine Vermischung zu vermeiden. Anschließend wurden die Röhrchen in einer Ultrazentrifuge 3h bei 28000rpm und 15°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die gereinigten Viren knapp oberhalb der Markierung als blaugraue Bande sichtbar. Die weiteren Schritte der Aufreinigung siehe Abschnitt 3.4.1.

3.4 DNA-Techniken

3.4.1 Isolation viraler DNA aus Viruspartikeln

Die bandierten Viren wurden mit einer Pipette abgenommen und gegen PBS dialysiert, wobei der Puffer zweimal gewechselt wurde. Die Dialyse wurde in einer Dialyse-Kassette (siehe Tabelle 12) durchgeführt deren Membran vorher mit PBS-Puffer befeuchtet wurde. Die Probe wurde vorsichtig mit einer Kanüle in die Kassette eingeführt und für 2-4 h bei RT dialysiert. Danach wurde die Probe wieder entnommen und weiter verarbeitet. Zum Aufbrechen der Viruspartikel wurde ein Proteinase-K Verdau durchgeführt. Dabei wurde zur Virussuspension 1:50 Volumen Proteinase-K, 1:20 Volumen SDS und 2µl T1-RNase pro 100µl Suspension dazu gegeben und ÜN bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Verdau noch 1h bei 50°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Der Verdau wurde in ein *Phase-Lock*-Röhrchen überführt und 1:1 mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1) versetzt und für 20 min in einem Überkopfschüttler gemischt. Danach wurden die Phasen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 14000rpm getrennt. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und 1:1 mit Chloroform versetzt um Reste von Phenol zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde gefällt (3.4.3) und in einer geeigneten Menge 10mM Tris (pH 8) resuspendiert.

3.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA zu isolieren (analytisch oder präparativ), wurde ein modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse (Beck et al., 1993) angewandt. Dafür wurden die *Kits* von QIAGEN® (Tip20, Maxi) gemäß der Anleitung verwendet.

Für die Isolierung kleinerer Mengen von Plasmid-DNA, wurde die alkalische Lyse verwendet. Es wurden 400-800µl einer Flüssigkultur 30sec zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 300µl P1 resuspendiert und mit 300µl P2 lysiert. Anschließend erfolgte mit 300µl P3 die Neutralisation und Renaturierung der Plasmide. Nach Zentrifugation (14000rpm, 10min) wurden 750µl des Überstandes wie bei 3.4.3. gefällt und gewaschen. Die DNA-Pellets wurden in einer *Speedvac* getrocknet

Die DNA wird in einem geeigneten Volumen 10mM Tris gelöst und die Konzentration bestimmt (3.4.4). Danach wird sie zur Klonierung, Transfektion und Sequenzierung verwendet.

3.4.3 DNA-Fällung

Für die Fällung von DNA wurde die Lösung mit 1/10 Volumen 3M NaOAc-Lösung und 0,9 Volumen Isopropanol versetzt und abzentrifugiert (13000rpm, 6min). Die gefällte DNA wurde mit Ethanol gewaschen und in 10mM Tris resuspendiert.

3.4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von gelöster DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260nm (A₂₆₀) bestimmt. Die Messung wurde entweder mit einer Quarzglasküvette in einem *SmartSpecTM* – Spektrometer (*Biorad*, München) durchgeführt oder mit einem *NanoDrop*-Spektralphotometer ND-1000 (*peqlab*, Erlangen).

3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet um DNA-Mengen abzuschätzen (z.B. vor einer Ligation), zur Kontrolle bei PCR-Reaktionen oder Klonierungen sowie präparativ zur Isolierung von DNA-Fragmenten. Standardmäßig wurde ein 0,66%iges (w/v) Agarosegel verwendet. Zur Herstellung wurde eine entsprechende Menge

Agarose in 1xTBE aufgeschmolzen und die Gellösung mit Ethidiumbromid (Endkonzentration im Gel: 0.66µg/µl) versetzt. Anschließend wurde die Agaroselösung in eine Flachbett-Gelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer versetzt und auf das auspolymerisierte, mit 1x TBE überschichtete Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte horizontal bei 5-10V/cm Trennstrecke. Je nach Verwendungszweck und DNA-Größe wurde die Elektrophorese zu einem geeigneten Zeitpunkt gestoppt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe des Geldokumentationssystems *GeneSnap* bei der Wellenlänge 312 nm visualisiert und dokumentiert. Bei präparativen Gelen wurde zur Schonung bei langwelligem UV-Licht (365nm) analysiert und isoliert (3.4.6). Um die Schädigung von UV-Licht an der DNA zu vermindern, wurden sowohl Gel als auch Laufpuffer mit 1mM Guanodin versetzt (Gründemann und Schömig, 1996).

3.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch Zentrifugation. Bei der Zentrifugation wurden zuerst die DNA-Fragmente auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und die DNA durch eine Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die gewünschte DNA-Bande wurde ausgeschnitten, in Eppendorfgefäße gefüllt und mit einer *Sorvall*-Zentrifuge zentrifugiert. Dabei wird die Agarose komprimiert, während die DNA mit dem Gellaufpuffer aus der Gelmatrix austritt. Dafür wurde der Rotor SS34 mit Adaptern für Eppendorfgefäße verwendet. Die Proben wurden bei 20000rpm, 90min, 10°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand gefällt, gewaschen (siehe 3.4.3) und die Konzentration der DNA bestimmt (siehe 3.4.4).

3.4.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde durchgeführt, um DNA zu amplifizieren und Erkennungsmotive für Restriktionsenzyme in die DNA-Sequenz einzuführen. Zur Kontrolle des Erfolgs der PCR wurde mit einem Aliquot des Ansatzes eine Agarose-Gelelektrophorese (3.4.5) durchgeführt.

3.4.7.1 Amplifikation der viralen Genomenden

Die Amplifikation des linken und rechten Genomendes wurde mit den schon genannten Primer (siehe Tabelle 5) durchgeführt. Die Bedingungen, mit denen die Amplifikation erreicht wurde, sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 14: Daten der Amplifikation der viralen Genomenden

Reaktionsgemisch:		Reaktionsbedingung:	
Matrix	100ng	95°C	2:00 min
Primer #2420 (ITR)	250ng	95°C	1:00 min
Primer #2421 (E1rev)	125ng	55°C	1:00 min
Primer # (E4fwd)	125ng	68°C	4:00 min
dNTPs (jeweils)	400µM	68°C	10:00 min
<i>PfuUltraTMII</i> Polymerase	2,5 U	4°C	∞
10x Reaktionspuffer	5µl		
H ₂ O	Ad 51µl		

27 Zyklen

3.4.7.2 Ortsgerichtete Mutagenese mittels PCR (*QuikChange*)

Die QuikChange Methode beruht auf der Verwendung von komplementären Primern, die an die zu mutagenisierenden Sequenzen der Plasmid-DNA binden und die Punktmutation einführen. Da bei der Reaktion die gesamte Länge der Plasmid-DNA amplifiziert wird, ist die Anwendung durch die Größe des zu mutierenden Plasmids

limitiert. Im Folgenden sind die Bedingungen der durchgeführten *QuikChange* angegeben.

Tabelle 15: Daten der *QuikChange*

Reaktionsgemisch:		Reaktionsbedingung:	
Primer #2418	125ng	95°C	2:00 min
Primer #2419	125ng	95°C	1:00 min
Matrize pPG-S5	25ng	55°C	0:40 min
dNTPs (jeweils)	400µM	68°C	1:00 min
<i>PfuUltra</i> TM II Polymerase	2,5U	68°C	10:00 min
10x Puffer	5µl	4°C	∞
H ₂ O	ad 51µl		

Das Produkt der *QuikChange*-Reaktion weist an den jeweiligen 5'-Enden der Primer Einzelstrangbrüche auf, was die Transformation des Plasmids in *E.coli* im Vergleich mit *supercoiled* DNA erheblich erschwert. Daher muss nach der PCR-Reaktion das Ausgangsplasmid (Matrize) durch eine Behandlung mit DpnI abgebaut werden.

3.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.5.1 Restriktionsspaltung

Zur Analyse von Plasmid-DNA wurde die DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen behandelt. Diese wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet. Die DNA wurde isoliert (siehe Kapitel 3.4.1) und direkt im Reaktionsgemisch aufgenommen. Der Reaktionsansatz wurde für 3h oder ÜN inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Kapitel 3.4.5). Bei säulengereinigten DNA wurden 0,5 - 1µg DNA mit dem jeweiligen Enzym für 1 - 2h

inkubiert. Für den präparativen Verdau von DNA wurden ca. 20µg DNA für 3 - 4h mit den jeweiligen Enzymen inkubiert.

3.5.2 Ligation

NaOAc/Isopropanol-gefällte linearisierte Vektor-DNA [1µg] (siehe Kapitel 3.4.3.) wurde vor der Ligation dephosphoryliert, um die Religation des Vektors zu vermeiden. Nach der erneuten Fällung wurden Vektor-DNA und DNA-Fragmente auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen, um die Konzentration der DNA abzuschätzen. Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden in einem drei- bis fünf-fachen Enden Überschuss zur Vektor-DNA in die Ligation eingesetzt. Dafür wurde der *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche AG, Basel, Schweiz) nach Herstellerangaben verwendet.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, das Genom von HAdV41 in einen Arbeitsvektor zu klonieren, der das Einführen zielgerichteter Mutationen erlaubt. Diese veränderten Bereiche können anschließend wieder in das Virusgenom zurückkloniert werden, um replikationskompetente Virusmutanten für weitere molekularbiologische Analysen und Infektionsreihen herzustellen. Die Arbeiten basieren dabei auf einem etablierten System mit dem bereits weitere HAdV Typen erfolgreich kloniert wurden.

Das System zur Klonierung von HAdV5 besteht aus dem in einen Minimalvektor (pPG-S2) klonierten Virusgenoms und dessen subklonierten Teilstücken („Boxen“). Nach Einfügen der gewünschten Mutation in die Zielsequenz der jeweiligen Box wird dieser Genomabschnitt getrennt von der Originalsequenz kloniert. Das somit entstandene Bacmid kodiert das HAdV 5-Genom mit der gewünschten Mutation. Der Zwischenschritt mit den Boxen ist notwendig, da das vollständige Bacmid zu groß ist, um es *in vitro* zu mutagenisieren. Aus diesem Bacmid kann man in der Zellkultur durch Transfektion in eine geeignete Helferzelllinie Viruspartikel generieren, die nach ihrer weiteren Vermehrung in mehreren Infektionsrunden gereinigt und weiter analysiert werden können.

4.1 Herstellung der HAdV41 E1-E4-Box

4.1.1 Gewinnung von HAdV41 Virus-DNA

Zur Vermehrung wurde ein Virusstock von HAdV41 unbekanntem Titer verwendet, der von Dr. Karin Kosulin (Kinderklinik der Stadt Wien) bereitgestellt worden war. Zehn Kulturschalen der Zelllinie H1299 wurden mit diesen Viren infiziert und nach 6 Tagen geerntet und aufgebrochen (siehe Kapitel 3.3.1). Im nächsten Schritt wurden die Viren durch Ultrazentrifugation in einem geschichteten CsCl-Gradienten (siehe Kapitel 3.3.3) bandiert. Die Virusbande wurde abgezogen, gegen PBS dialysiert und die DNA nach Abbau der Viruskapside durch einen ProteinaseK-Verdau aufgereinigt (siehe Kapitel 3.4.1).

4.1.2 Konstruktion HAdV41 E1-E4-Box

Die E1- und die E4-Region befinden sich unmittelbarer Nähe des 5'- bzw. 3'-Endes des viralen Genoms. Nach Konvention stellt die E1-Region das linke Genomende und die E4-Region das rechte Genomende dar. Zur Generierung der HAdV41 E1-E4-Box sollten die beiden Genomenden über geeignete anzufügende Restriktionsschnittstellen miteinander verknüpft und in einen bakteriellen Vektor ligiert werden.

4.1.3 Generierung des Vektors pPG-SfiI

Ausgangsvektor war pPG-S5, ein Minimalvektor aus der Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe, mit einem Resistenzgen gegen Ampizillin und einem Replikationssignal. In diesen wurde mittels *in-vitro* Mutagenese (siehe Kapitel 3.4.7.2) mit den Primern #2418 und #2419 (siehe Tabelle 5) die Restriktionsschnittstelle für SfiI eingefügt und

Ergebnisse

gleichzeitig eine der beiden Restriktionsschnittstellen für PacI entfernt (siehe Abb. 3).

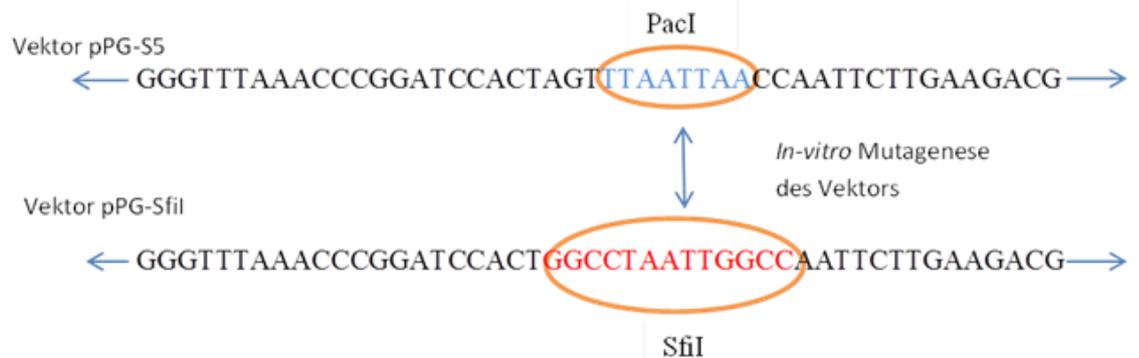


Abbildung 3: Generierung des Vektors pPG-SfiI: Die Grafik zeigt die Umwandlung der Restriktionsschnittstelle PacI in pPG-S5 in die SfiI-Erkennungssequenz in pPG-SfiI durch *in-vitro* Mutagenese.

Vor der chemischen Transformation in *E.coli* DH5 α wurde das PCR-Produkt mit DpnI verdaut. Dabei macht man sich zu Nutze, dass das Enzym DpnI nur methylierte DNA abbaut und somit den Ansatz von der Matrizen-DNA befreit. Nach der Transformation entstandene Klone wurden durch einen analytischen Verdau mit SfiI auf erfolgreiche Mutagenese untersucht (siehe Abb. 4).

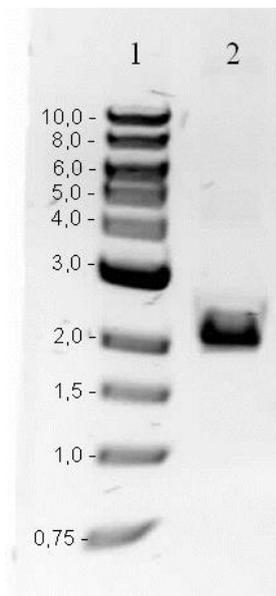


Abbildung 4: Verdau des Vektors pPG-SfiI: 1) 1kB-Leiter; 2) Mit SfiI linearisierter Vektor pPG-SfiI. Die Probe wurde auf einem 0.66% igen- Agarosegel aufgetrennt.

4.1.4 Amplifikation des linken und des rechten Genomendes

Die Erkennungssequenzen der gewählten Restriktionsenzyme sollen die zu klonierenden Bereiche des Virusgenoms unmittelbar flankieren und dadurch sicherstellen, dass das entstehende Plasmid nicht zu groß für die *in-vitro* Mutagenese wird. Für die Rückklonierung des mutagenisierten Genomabschnitts in das Virusgenom ist außerdem wichtig, dass jeweils nur eine Erkennungssequenz im Virusgenom pro Enzym vorliegt.

Für die E1-Region wurde das Enzym SfiI gewählt, das bei nt 7219 seine Erkennungssequenz hat. Nicht nur E1A und E1B sondern auch pIX und ein großer Teil der viralen DNA-Polymerase kodieren in diesem Genomabschnitt. Das Restriktionsenzym PacI hat seine Erkennungssequenz bei nt 28538. In dem Genomfragment von nt 28538 bis zum rechten Ende des Virusgenoms befinden sich die E4-Region und die Gene beider Fiberproteine.

Während der PCR-Reaktion (siehe Kapitel 3.4.7.1) zur Amplifikation beider Genomenden wurde absichtlich eine artifizielle Restriktionsschnittstelle für das Enzym MluI eingeführt, welches weder in Genom noch Vektor eine Erkennungssequenz aufweist. Dies erlaubt die Ligation beider Genomenden, was wegen der Inkompatibilität der DNA-Überhänge der Restriktionsschnittstellen von PacI und SfiI sonst nicht möglich gewesen wäre. Beim späteren Einsetzen des zentralen Teils des Virusgenoms (nt 7224 - 28537) durch eine gerichtete Klonierung in die Restriktionsschnittstellen von PacI und SfiI wird die Restriktionsschnittstelle für MluI wieder entfernt.

Durch die Komplementarität der viralen ITRs kann dasselbe Oligonukleotid als Primer (#2420) bei beiden Amplifikationen verwendet werden. Oligonukleotid #2421 erkennt die Sequenz von nt 7223-7190 und wird in der PCR-Reaktion revers verlängert bis zum

Ergebnisse

linken Genomende, während #2422 komplementär zu nt 28538-28567 ist und vorwärts bis zum rechten Genomende verlängert wird (siehe Abb.5).

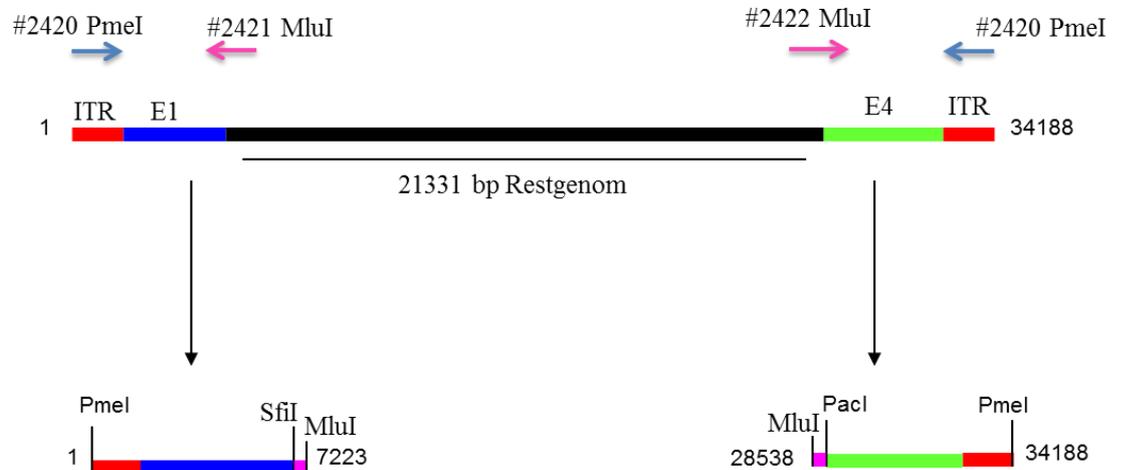


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Amplifikation des rechten und linken Genomendes von HAdV41.

4.1.5 Herstellung der kombinierten E1-E4-Box

Die Klonierung der beiden Genomenden in den bakteriellen Vektor pPG-SfiI wurde mittels einer Dreipunktligation durchgeführt. Der Vektor pPG-SfiI wurde mit dem Restriktionsenzym PmeI linearisiert, während die beiden DNA-Fragmente der Genomenden vor der Ligation mit PmeI/MluI verdaut wurden (siehe Abb. 8A). Das so entstandene Plasmid wurde in *E.coli* XL2-Blue transformiert (siehe Kapitel 3.1.2) und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Einzelkolonien wurden in LB-Medium angezogen und überprüft. Dazu wurde durch alkalische Lyse (siehe Kapitel 3.4.2) die DNA gewonnen und durch einen Verdau mit PmeI/PacI das Restriktionsmuster kontrolliert (siehe Abb. 6).

Ergebnisse

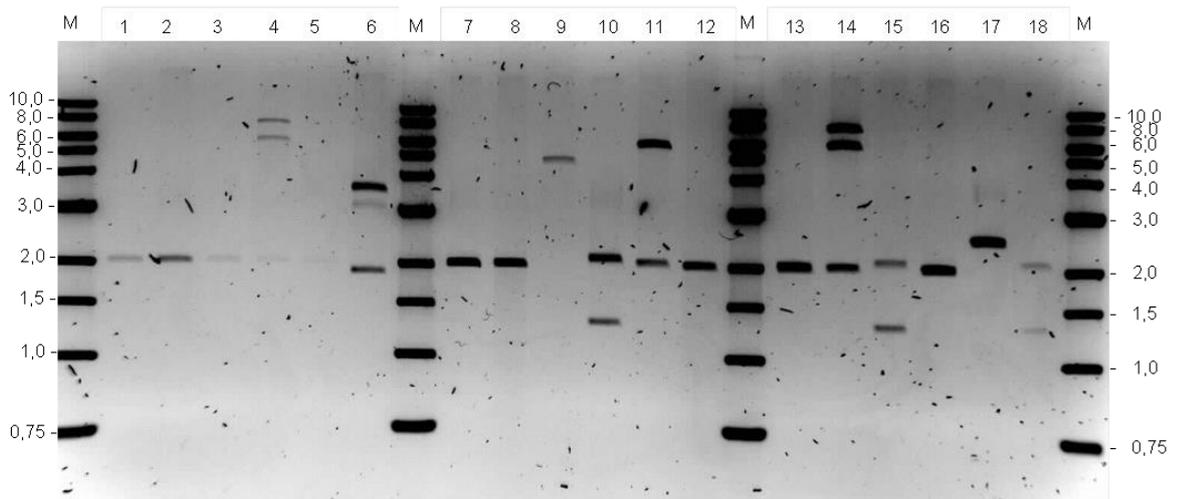


Abbildung 6: PmeI/PacI-Verdau: M=Marker; kB-Leiter. Die DNAs einzelner Klone (1-18) wurden mit PacI/PmeI bei 37°C für 3h verdaut, auf ein 0.66%iges Agarosegel aufgetragen und zwei Stunden bei 120 Volt aufgetrennt. Nach diesem Verdau wurden drei Fragmente erwartet: ein 2kB, ein 5.7 kB und ein 7.3 kB DNA-Fragment. Die meisten Klone hatten nur den leeren Vektor aufgenommen (Spuren 1, 2, 3, 5, 7, 8, 12, 13 und 16) oder wiesen deletierte Plasmide auf (Spur 6, 9, 17 und 18). Zwei Klone (Spur 4 und 14) haben das erwünschte Restriktionsmuster.

Von beiden als Treffer identifizierten Klonen (Spuren 4 und 14) wurde DNA isoliert (siehe Kapitel 3.4.2) und Konzentrationsbestimmungen der DNA durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.4).

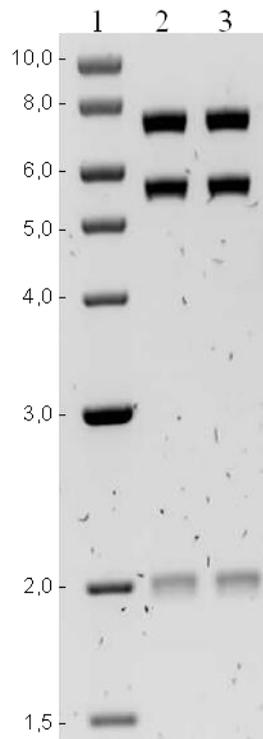


Abbildung 7: PmeI/PacI Restriktionsverdau der E1-E4-Box: 1)1kB-Leiter; 2) Klon 4; 3) Klon 14; Verdau der E1-E4-Boxen mit PacI/PmeI für 1.5h bei 37°C im Thermoschüttler. Die beiden Proben wurden auf einem 0.66%igen Agarosegel aufgetrennt.

4.1.6 Generierung der einzelnen E1-Box und E4-Box Plasmide

Die E1-E4-Box ist aufgrund ihrer Größe (14988bp) an der Grenze der *in-vitro* Mutagenisierbarkeit. Daher wurde schon bei der Konstruktion des Vektors pPG-SfiI darauf geachtet, dass nach der Dreipunktligation die Erkennungssequenzen sowohl von PacI als auch von SfiI im Vektor distal zu den gleichen Erkennungssequenzen im jeweiligen Genomende stehen.

Dies ermöglichte es die E1-E4-Box mit SfiI und in einem zweiten Ansatz mit PacI einzeln zu verdauen und die dabei entstehenden DNA-Fragmente direkt zu religieren. Bei dem Ansatz mit PacI entsteht dabei die E4-Box (7688bp) während bei dem mit SfiI die E1-Box (9264bp) generiert wird (siehe Abb. 8B). Diese beiden Boxen sind klein genug für eine *in-vitro* Mutagenese und können nach Verdau mit PacI respektive SfiI

Ergebnisse

direkt in das mit dem jeweils gleichen Enzym linearisierte Bacmid zurück kloniert werden.

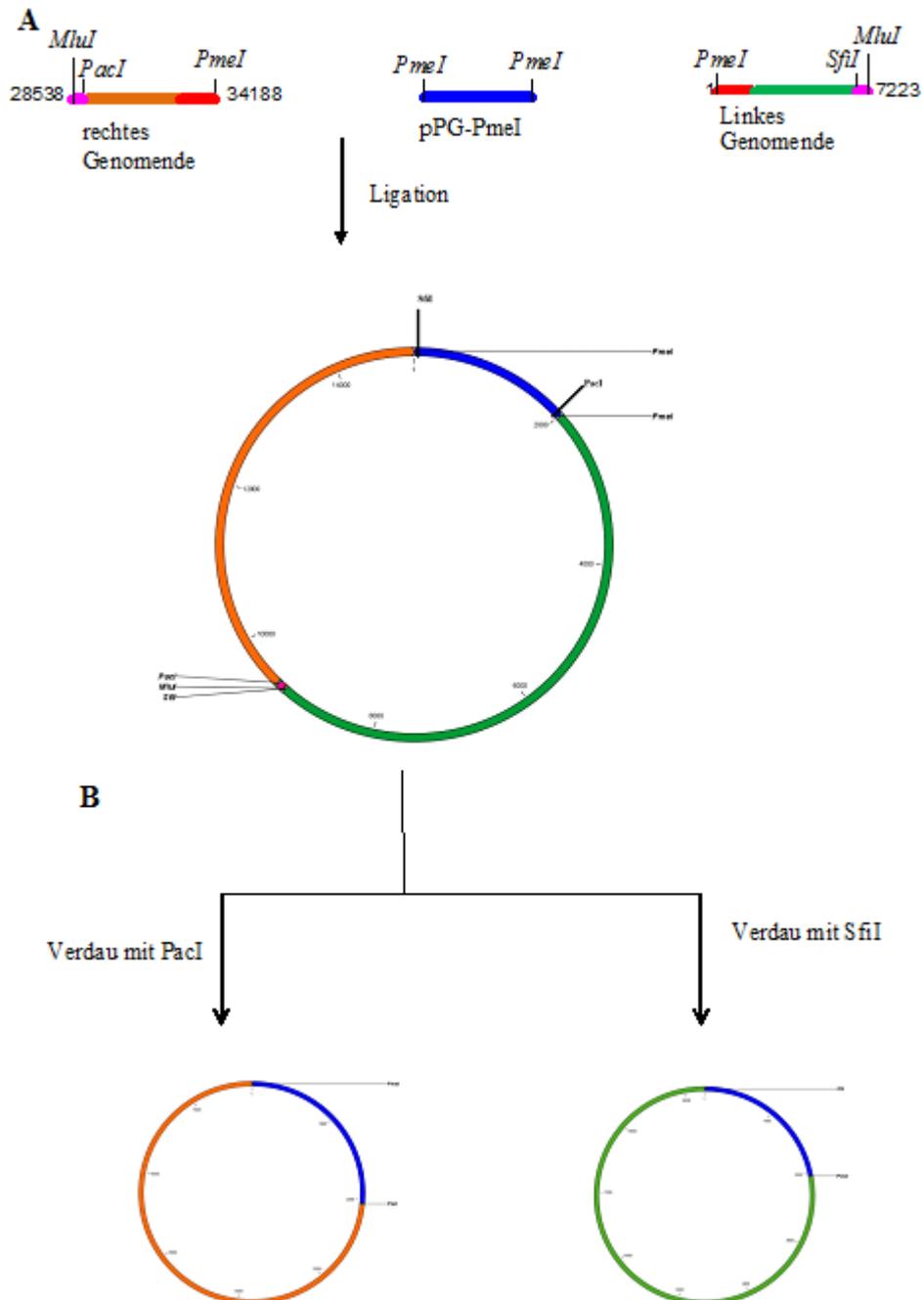


Abbildung 8: A) Generierung der E1-E4-Box: Vermittels einer Dreipunktligation wurden rechtes und linkes Genomende in den Vektor pPG-SfiI ligiert. B) Herstellung von E1- und E4-Box: Durch den Verdau der E1-E4-Box mit *SfiI* oder *PacI* und anschließender Religation entsteht nach Transformation in *E.coli* die E1- bzw. die E4-Box.

4.1.7 Vervollständigung des HAdV41-Bacmids

Vor dem letzten Arbeitsschritt sollte nach einem Restriktionsverdau mit PmeI der Vektor pPG-SfiI der HAdV41-E1-E4-Box gegen den mit PmeI linearisierten Vektor pPG-PmeI ausgetauscht werden. Dies ermöglicht die Linearisierung der E1-E4-Box über den Restriktionsverdau mit PacI und SfiI.

Zur Generierung des vollständigen Bacmids sollte das fehlende zentrale Genomteil durch einen Restriktionsverdau mit SfiI und PacI aus viraler DNA gewonnen werden. Der zentrale Teil des Virusgenoms ist 21331bp groß und umfasst nt7224 bis nt 28537 (siehe Abb. 9A). Mittels einer präparativen Agarosegelelektrophorese (3.4.5) kann er von den beiden Genomenden abgetrennt werden und nach Isolierung der DNA aus dem Gel (3.4.6) mit PacI/SfiI linearisierter E1-E4-Box verknüpft werden (siehe Abb. 9B). Der Vektor pPG-PmeI wird nun wieder gegen den Vektor pPG-SfiI ausgetauscht, damit die mutagenisierte E1- oder E4-Boxen in das Bacmid eingesetzt werden können. Damit wäre das Genom von HAdV41 vollständig kloniert und ein beträchtlicher Anteil desselben einer Mutagenese zugänglich. Durch die äußerst aufwändige und zeitraubende Vermehrung von HAdV41 in Zellkultur hätte dieser letzte Schritt den zeitlichen Rahmen überschritten und muss daher einer weiterführenden Arbeit vorbehalten bleiben.

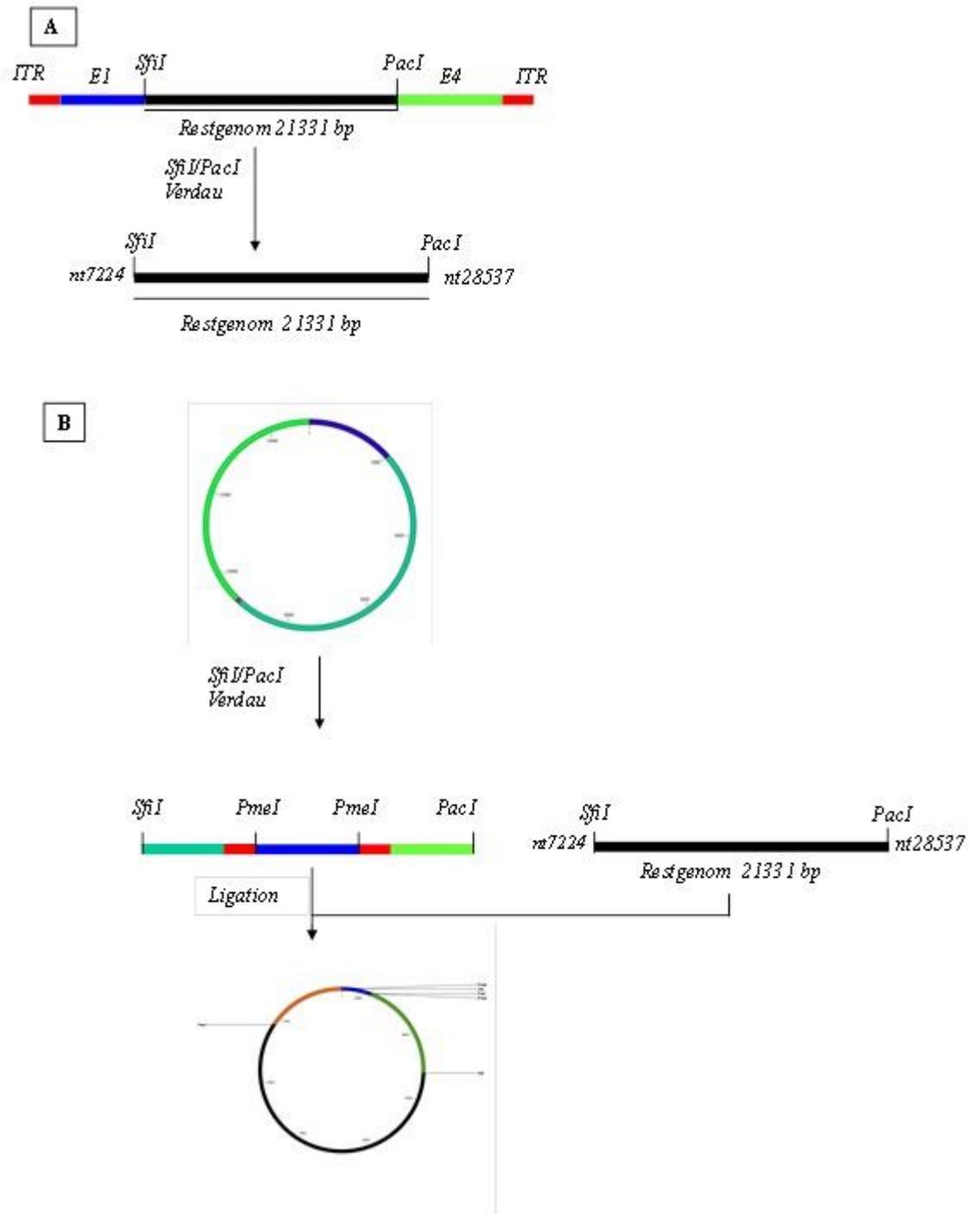


Abbildung 7: Klonierung HAdV41: A) Restriktionspaltung von viraler DNA mit SfiI und PacI zur Isolierung des zentralen Genomabschnitts. B) Ligation des zentralen Genomabschnitts in die PacI/SfiI linearisierte E1-E4-Box.

5 Diskussion

5.1 Das Klonierungssystem HAdV41

5.1.1 Gewinnung von Virus-DNA

HAdV41 ist schwer in der Zellkultur zu vermehren, da es in dieser nur schwach infektiös ist und sich nur langsam vermehren kann. Im Gegensatz zu anderen HAdV-Typen, die nach Abschluss der Virusvermehrung die Zellen lysieren, wird HAdV41 anscheinend von Zelle zu Zelle weitergegeben. Außerdem werden pro Zelle deutlich weniger Viruspartikel gebildet als bei anderen HAdV-Typen (Tiemessen and Kidd 1995; Pieniazek et al. 1990).

Die Propagation von HAdV41 wurde in der Zelllinie H1299 durchgeführt. In vielen anderen Zelllinien kann sich HAdV41 nicht vermehren. Bei der Helferzelllinie HEK293 gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen. Bei manchen Arbeitsgruppen konnte HAdV41 ohne Probleme in der Zelllinie HEK293 vermehrt werden (Siquera-Silva et al., 2009). Andere Arbeitsgruppen konnten in der Zelllinie HEK293 keine Viruspartikel generieren (Pieniazek et al., 1990; Leung et al., 2010). Aus diesem Grund wurde während dieser Arbeit Abstand von der Helferzelllinie HEK293 genommen. Die zur Vermehrung von Adenoviren üblicherweise verwendete Zelllinie A549 kann von HAdV41 nur schwer infiziert werden, da es anstatt eines RGD-Motivs im Pentonbasisprotein ein IGDD-Motiv besitzt und damit die Bindung an den CAR-Rezeptor und die Aufnahme in die Zellen erheblich erschwert ist (Albinsson und Kidd, 1999).

Durch die Vermehrung der Viruspartikel in H1299 konnte jedoch genügend DNA gewonnen werden um wesentliche Teile des Virusgenoms zu klonieren.

5.1.2 Herstellung des HAdV41 Klonierungssystem

Zur Generierung von rekombinanten HAdV wird zumeist die homologe Rekombination in eukaryontischen Zellen oder Bakterien verwendet. Die Nutzung von eukaryontischen Zellen ist ineffizient, langwierig und arbeitsintensiv, da die Selektion der rekombinanten Viren in der Regel mehrere Plaqueaufreinigungszyklen benötigt.

Eine Verbesserung wird durch die Verwendung von homologer Rekombination in *E.coli* bewirkt, da dies zur Vermehrung der Klone mit rekombinanter viraler DNA führt. Viele der heute verwendeten Klonierungssysteme beruhen darauf. Der Nachteil dieses Systems ist die schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, wegen der Nutzung eines rekombinations kompetenten Bakterienstamms. Um die Benutzung der rekombinations kompetenten Bakterien zu umgehen, werden immer öfter direkte Klonierungssysteme verwendet (Gao et al., 2003; Groitl und Dobner, 2007; Mailly et al., 2008), die sich durch ihre Schnelligkeit und Effizienz auszeichnen.

In dieser Arbeit konnte mithilfe eines direkten Klonierungsverfahrens ein großer Teil des Genoms von HAdV41 kloniert werden und ein System zur gezielten Mutagenese der E1- und E4-Genombereiche hergestellt werden (5.1). Das bis hier entwickelte System besteht aus einer HAdV41-E1-E4-Box, eines fast 15 kbp großen Plasmids, und der beiden Tochterplasmide E1-Box und E4-Box, die 9264 bp bzw. 7688 bp groß sind.

Zur vollständigen Klonierung des HAdV41 Genoms sollte in einem letzten Schritt der zentrale Teil von nt7224-28537 durch präparative Agarosegelelektrophorese nach einem PacI/SfiI-Verdau viraler DNA isoliert und in die E1-E4-Box ligiert werden. Hierfür wäre eine größere Menge Virus-DNA nötig gewesen.

Wegen der bei Kapitel 6.1.1 beschriebenen Probleme bei der Vermehrung von HAdV41 müsste eine Helferzelllinie hergestellt werden um mehr Virus DNA in die Hand zu bekommen. Es wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen verschiedene Helferzelllinien hergestellt. Dabei wurden 293-Zelllinien erstellt, die zusätzlich zu E1A und E1B von Ad5 E1B-55K von HAdV41 exprimieren. Für die Zelllinie 293E12 wurde HAdV41, nach der Hirt-Methode, aus Stuhlproben von Kindern isoliert und das E1B-55K wurde über eine PCR amplifiziert. Die Arbeitsgruppe erstellte einen Vektor mit E1B-55K und transfizierte diesen in HEK293-Zellen. Auf den HAdV41-E1B-55K positiven Zellen können Wildtyp und Klone von HAdV41 generiert werden (Lu et al., 2009).

Bei der neu hergestellten Zelllinie 293TE7 wurde ein anderer Vektor zur Expression von HAdV41-E1B-55K verwendet. Diese Zelllinie exprimiert in höherer Menge HAdV41-E1B-55K. Der Wildtyp von HAdV41 kann in dieser Zelllinie 7-15-mal mehr gebildet werden als in 293E12 (Zou et al., 2011; Chen et al., 2012).

5.2 Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Vektorsystem bietet ein großes Potenzial für die HAdV41-Grundlagenforschung. Neben gezielten Mutagenesen in der E1- und der E4-Region, die die wichtigsten regulatorischen und transformierenden Genprodukte kodieren, können auch Mutationen in den Genen von pIX, IVa2, beider Fiberproteine und des größten Teils der viralen DNA-Polymerase eingeführt werden.

Das Protein pIX dient als stabilisierendes Element des Kapsids und als unspezifischer Transaktivator der Transkription (Furcinitti et al., 1989; Lutz et al., 1997; Rosa-Calatrava et al., 2001).

Das Protein IVa2 ist auch ein Transaktivator, der die spezifische Transkription von späten Promotoren (*major late promotor*, MLP) fördert (Pardo-Mateos und Young, 2004; Tribouley et al., 1994). Ebenfalls ist es als Spezifitätsfaktor an der Erkennung des Verpackungssignals der viralen DNA beteiligt (Ostapchuk et al., 2005; Perez-Romero et al., 2005).

Die Fibergene sind auch der Mutagenese zugänglich; dies bietet den Vorteil, dass eine Änderung des Wirtszelltropismus durch verschiedenartige Modifikationen der Fiber durchgeführt werden kann. Durch diese Modifikationen besteht die Möglichkeit, auch Zellen zu infizieren, die sonst nicht von HAdV41 infiziert werden. Des Weiteren können durch Subklonierung anderer kodierender Bereiche aus dem HAdV41-Bacmid zusätzliche Mutagenese-Boxen generiert werden, mit denen auch weitere virale Gene der Mutagenese zugänglich gemacht werden.

Nicht nur detaillierte Grundlagenforschungen werden mit diesem Klonierungssystem ermöglicht, sondern es hat auch ein großes Entwicklungspotential als Vektorsystem für Gentherapien. Dadurch könnte die hohe Seroprävalenz für Antikörper gegen HAdV5 und HAdV2 in der Bevölkerung umgangen werden.

6 Zusammenfassung

Die am Besten untersuchten Adenoviren sind HAdV 5 und 2, die beide zur Spezies C gehören. Die Spezies F besteht nur aus zwei Vertretern; HAdV 40 und 41 und ist trotz ihrer großen klinischen Relevanz nicht annähernd so gut charakterisiert.

In dieser Arbeit wurden umfangreiche Teile des Genoms von HAdV 41 in ein Bacmid-System kloniert, um das Virus einer gezielten Mutagenese zugänglich zu machen und die mutagenisierten Abschnitte in das virale Genom zurück zu klonieren. Das etablierte Klonierungssystem ermöglicht erstmalig die Generierung und eingehende Charakterisierung von HAdV 41 Virusmutanten, was langfristig zu einem besseren Verständnis der Biologie von Spezies F Adenoviren beitragen wird.

7 Literaturverzeichnis

Albinsson, B. und Kidd, A. H. (1999). Adenovirus type 41 lacks an RGD av-integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A549 cells. *Virus Res*, 64:125 - 136.

Audu, R., Omilabu, A. S., Peenze, I. und Steele, D. A. (2002). Isolation and identification of adenovirus recovered from the stool of children with diarrhoea in Lagos, Nigeria. *Afr J Health Sci*, 9:105 - 111.

Beck, K. F., Stathopoulos, I., Berninger, M. G., und Schweizer, M. (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques*, 14:375.

Berk, A. J. (2007). Adenoviridae: The viruses and their replication. In Knipe, D. M. und Howley, P. M., editors, *Fields Virology*, pp. 2355–2394. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Benkó, M., Elo, P., Ursu, K., Ahne, W., LaPatra, S. E., Thomson, D., und Harrach, B. (2002). First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol*, 76:10056 - 10059.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M., und Short, J. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with galactosidase selection. *Biotechniques*, 5:376 - 379.

Campos Samuel K. und Barry Michael A. (2007). Current advanced and future challenges in adenoviral vector biology and targeting. *Curr Gene Ther*, 7:189 - 204.

Chen, D. L., Dong, L. X., Li, M., Guo, X. J., Wang, M., Liu, X. F., Lu, Z. Z. und Hung, T. (2012). Construction of an infectious clone of human adenovirus type 41. *Arch Virol*, 157:1313 - 1321.

Cuconati, A. und White, E. (2002). Viral homologs of bcl-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev*, 16:2465 - 2478.

Danthinne, X. und Imperiale, M. (2000). Production of first generation adenovirus vector: a review. *Gene Ther*, 7:1707 - 1714.

Davison, A. J., Benkő, M. und Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenovirus. *J Gen Virol*, 84:2894 - 2908.

Dey, R. S., Ghosh, S., Chawla-Sarkar, M., Panchalingam, S., Nataro, J. P., Sur, D. und Manna, B. (2011). Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among below 5 years of age in Kolkata, India. *J Clin Microbiol*, 49:500 - 505.

- Dulbecco, R. und Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8:396 - 397.
- Furcinitti, P. S., van Oostrum, J., und Burnett, R. M. (1989). Adenovirus polypeptide IX revealed as capsid cement by difference images from electron microscopy and crystallography. *EMBO J*, 8:3563 - 3570.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., und Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51:1417 - 1423.
- Gao, G., Zhou, X., Alvira, M. R., Tran, P., Marsh, J., Lynd, K., Xiao, W., und Wilson, J. M. (2003). High throughput creation of recombinant adenovirus vectors by direct cloning, greenwhite selection and I-Sce I-mediated rescue of circular adenovirus plasmids in 293 cells. *Gene Ther*, 10:1926 - 1930.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C. und Nairn, R. (1977). Characteristic of Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol*, 36:59 - 72.
- Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P., und Helenius, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 75:477 - 486.
- Groitel, P. und Dobner, T. (2007). Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. *Methods Mol Med*, 130:29 - 39.
- Gründemann, D. und Schömig, E. (1996). Protection of DNA during preparative agarose gel electrophoresis against damage induced by ultraviolet light. *Biotechniques*, 21:898 - 903.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166:557 - 580.
- Hilleman, M. R. und Werner, J. H. (1954). Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med*, 85:183 - 188.
- Kamel, A.H., El-Nady, H. G., Rougemont, A., Pothier P., Belliot, G. (2009). Predominance and circulation of enteric viruses in the region of Greater Cairo, Egypt. *J Clin Microbiol*, 47:1037 - 1045.
- Leung, T. K. H. und Brown, M. (2010). Block in entry of enteric adenovirus type 41 in HEK293 cells. *Virus Res*, 156:54 - 63.
- Lieber, A., He, C. Y.; Meuse, L., Schowalter, D., Kirillova, I., Winther, B., und Kay, M. A. (1997). The role of Kupfer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vector. *J. Virol*, 71:8797 - 8807.

- Ling, D. L., Dong, L. X., Li, M., Gou, X. J., Wang, M., Liu, X. F., Lu, Z. Z. und Hung, T. (2012). Construction of an infectious clone of human adenovirus type 41. *Arch Virol*, 157:1313 - 1321.
- Liu, Q. und Murve, D. A. (2003). Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther*, 10:935 - 940.
- Lu Z.Z, Zou, X. H., Dong, L. X, Qu, J. G., Song, J. D., Wang, M. und Hung, T.(2008). Novel recombinant adenovirus type 41 vector and biological properties. *J Gene Med*, 11:128 - 138.
- Lutz, P., Rosa-Calatrava, M., und Kedinger, C. (1997). The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J Virol*, 71:5102 - 5109.
- Mailly, L., Boulade-Ladame, C., Orfanoudakis, G., und Deryckere, F. (2008). A novel adenovirus vector for easy cloning in the E3 region downstream of the CMV promoter. *Viol J*, 5:73.
- Martin, M. A..In Knipe, D. M., Fields, und Howley, P. M. (2007). *Fields Virology*. pp. 2395. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., und Minna, J. D. (1992). p53 gene mutations in non-smallcell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*, 7:171 - 180.
- Nevins, J. R. (2007). Cell Transformation by Viruses. In Knipe, D. M. und Howley, P. M., editors, *Fields Virology*, pp. 209–248. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Nevins, J. R., Ginsberg, H. S., Blanchard, J. M., Wilson, M. C., und Darnell, J. E. (1979). Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units. *J Virol*, 32:727 - 733.
- Ostapchuk, P., Yang, J., Auffarth, E. und Hearing, P. (2005). Functional interaction of the adenovirus IVa2 protein with adenovirus type 5 packaging sequences. *J Virol*, 79:2831 - 2838.
- Pardo-Mateos, A. und Young, C. S. H. (2004). Adenovirus IVa2 protein plays an important role in transcription from the major late promoter in vivo. *Virology*, 327:50 - 59.
- Peng, Z. (2005). Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*, 16:1016 - 1027.
- Perez-Romero, P., Tyler, R. E., Abend, J. R., Dus, M., und Imperiale, M. J. (2005). Analysis of the interaction of the adenovirus L1 52/55-kilodalton and IVa2 proteins with the packaging sequence in vivo and in vitro. *J Virol*, 79:2366 - 2374.

- Pieniazek, D., Pieniazek, N. J., Macejak, D., Coward, J., Rayfield, M. und Liftig, R. B. (1990). Differential growth of human enteric adenovirus 41 (TAK) in cell lines. *Virology*, 174: 239 - 249.
- Roelvink, P. W., Lizonva, A., Lee, J. G. M., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I. und Wickham, T. J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E and F. *J Virol*, 72:7909 - 7915.
- Rosa-Calatrava, M., Grave, L., Puvion-Dutilleul, F., Chatton, B., und Kedinger, C. (2001). Functional analysis of adenovirus protein IX identifies domains involved in capsid stability, transcriptional activity, and nuclear reorganization. *J Virol*, 75:7131 - 7141.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., und Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 84:570 - 573.
- Sidiri-Loulizi, K., Gharbi-Khelifi, H., de Rougemont, A., Hassine, M., Sakly N., Pothier, P., Guédiche, M. N., Aouni, N. und Ambert-Balay, K. (2009). Molecular epidemiology of human astrovirus and adenovirus serotypes 40/41 strains relates to acute diarrhea in Tunisian. *J Med Virol*, 11:1895 - 1901.
- Siqueira-Silva, J., Yada, F. P., Favier, A. L., Mezin, P., Silva, M. L., Barella, K. M., Mehrert, D., Fender, P. und Hári, C. M.. (2009). Infection kinetics of human adenovirus serotype 41 in HEK 293 cells. *Mem Inst Oswald Cruz*, 104:736 - 744.
- Stewart, P. L., Fuller, S. D., und Burnett, R. M. (1993). Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J*, 12:2589 - 2599.
- Täuber, B. und Dobner, T. (2001). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene*, 278:1 - 23.
- Tiemessen, Caroline T. und Kidd, Alistair H. (1995). The subgroup F adenoviruses. *Journal of General Virology*, 76:481 - 497.
- Tribouley, C., Lutz, P., Staub, A., und Kedinger, C. (1994). The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. *J Virol*, 68:4450 - 4457.
- Uhnoo(1984). Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J Clin Microbiol*, 20:365 - 372.
- Volpers, C. und Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*, 6:164 - 171.

Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L. und Nemerow, G. R. (2005). Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol*, 79:1992 - 2000.

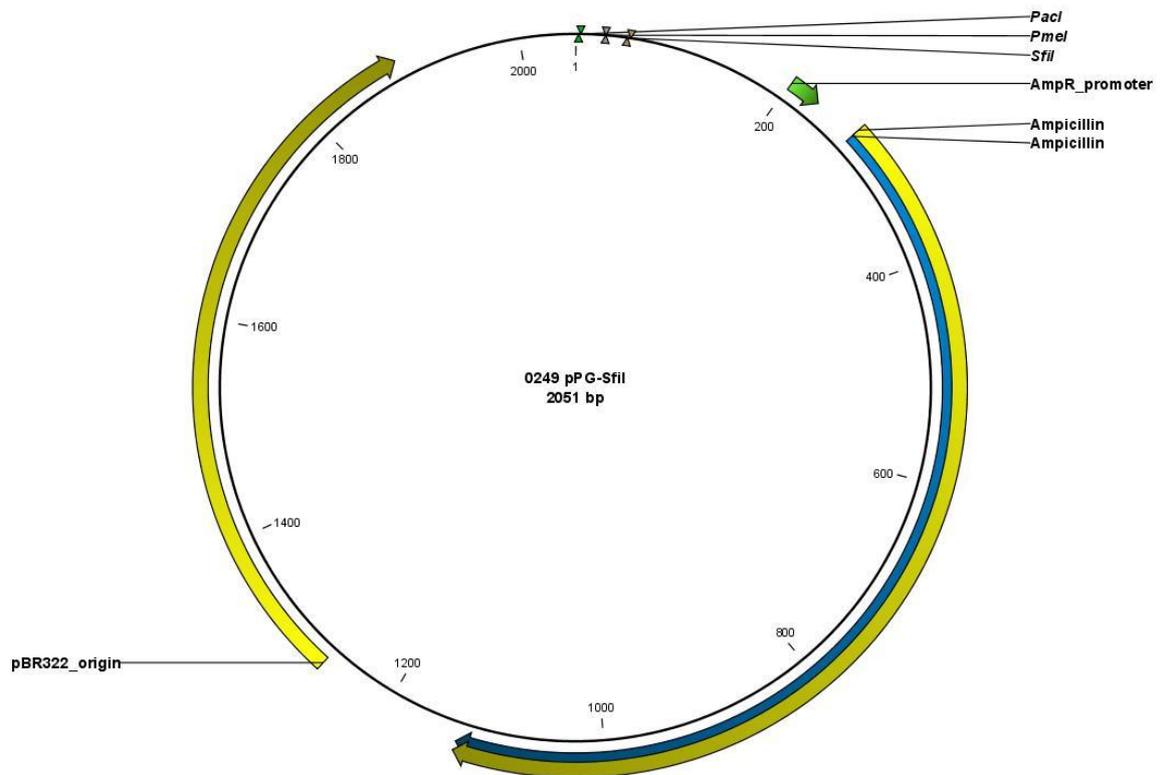
Wu, E., Dan, L. P., Seggern, J., Mullen, T. M., Mikiyas, Y., Stewart, P. L. und Nemerow, G. R. (2003). Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol*, 77:7225 - 7235

Wold, W. S. M. und Horwitz, M. S. (2007). Adenoviruses. In Knipe, D. M. und Howley, P. M., editors, *Fields Virology*, pp. 2395–2436. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

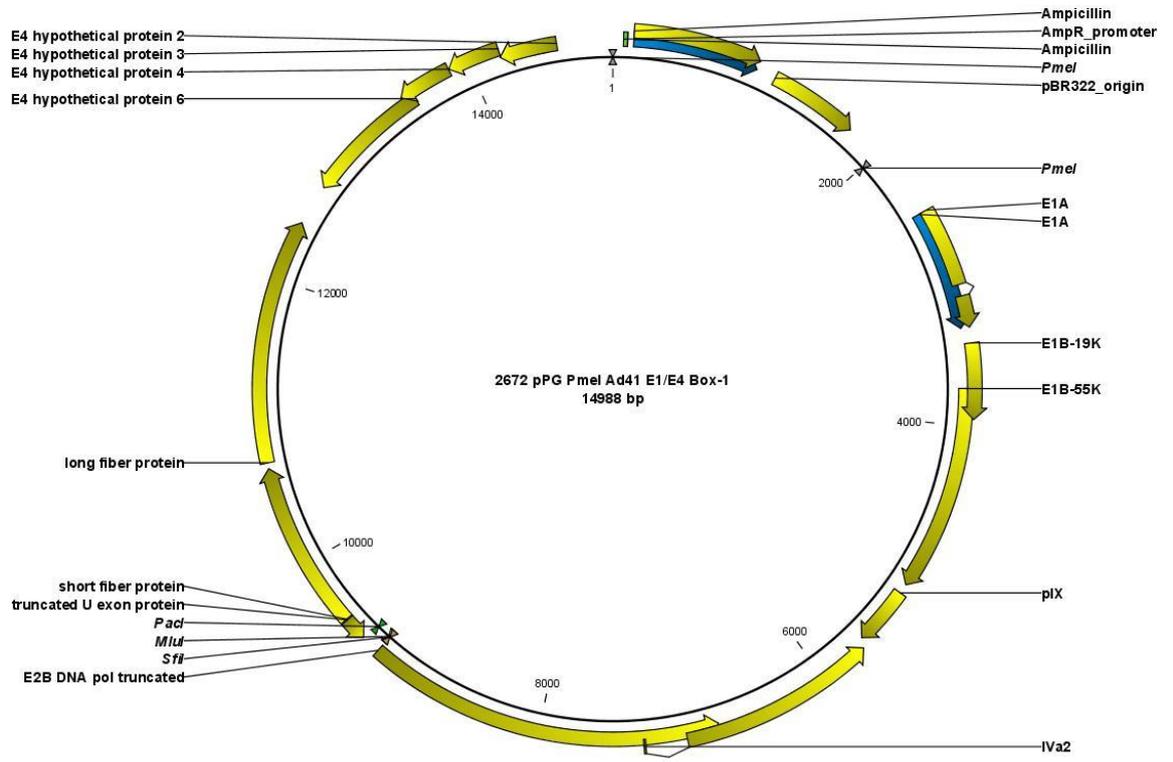
Zou, X. H., Xiao, X., Chen, D. L., Li, Z. L., Song, J. D., Wang, M., Qu, J. G., Lu, Z. Z. und Hung, T. (2011). An improved HAdV-41 E1B55K-expressing 293 cell line for packaging fastidious adenovirus. *J Virol methods*, 175:188 – 196.

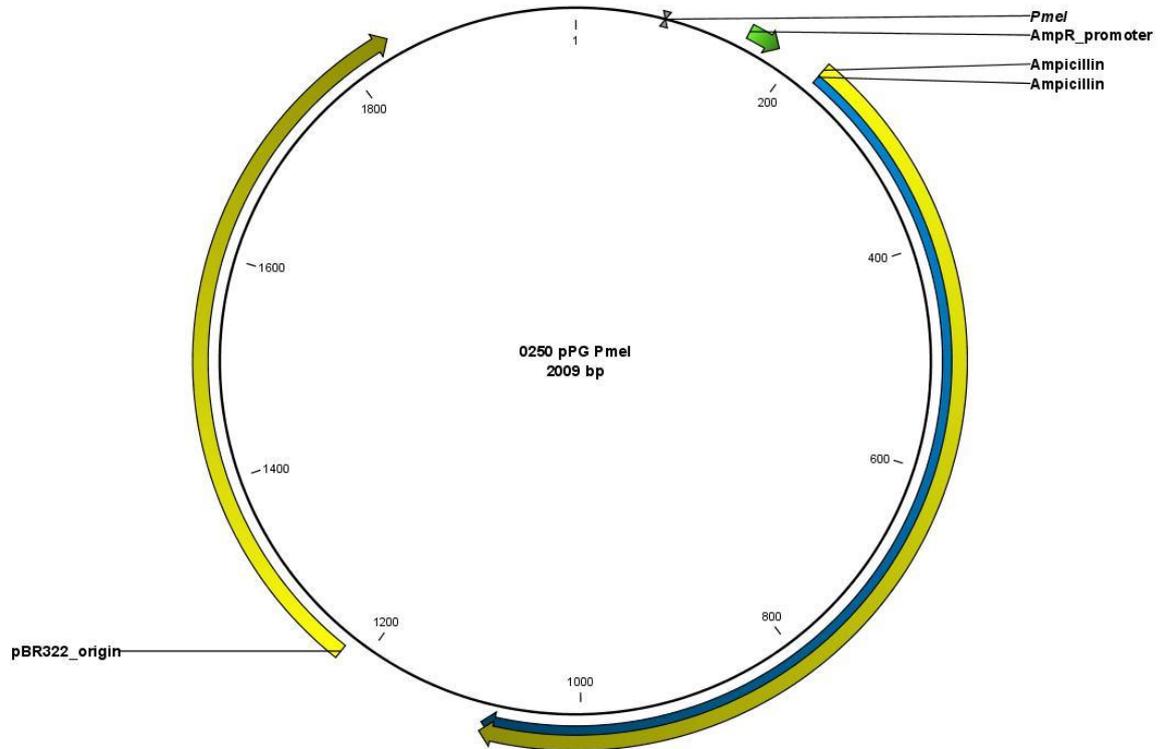
8 Anhang

Genkarten



Anhang





Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und unter ausschließlicher Benutzung der angegebenen Mittel und Methoden angefertigt habe.

Hamburg, den 29.08.14