

**Molekulare Charakterisierung  
der mit dem frühen cytopathischen Effekt  
assoziierten Domänen  
der Adenovirus-Pentonbasis**

Aus dem Institut für Virologie und Seuchenhygiene  
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Molekulare Charakterisierung  
der mit dem frühen cytopathischen Effekt  
assoziierten Domänen  
der Adenovirus-Pentonbasis**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
in der Medizinischen Hochschule Hannover

**vorgelegt von**

Christian Erich Werner Moritz  
aus Celle

Hannover, 2005

---

---

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover  
am: 15. Februar 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann

Betreuerin: PD Dr. Patricia Pring-Åkerblom

Referent: Prof. Dr. Georg Herrler

Korreferent: PD Dr. Albert Heim

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2006

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. Hans-Heinrich Kreipe

Prof. Dr. Reinhard Brunkhorst

Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

---

<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>6</b>
Abkürzung der proteinogenen Aminosäuren .....	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
1.1 Entdeckung der Adenoviren .....	<b>9</b>
1.2 Klassifikation .....	<b>10</b>
1.3 Organisation des Genoms .....	<b>11</b>
1.4 Morphologie des Adenovirions .....	<b>12</b>
1.5 Infektion .....	<b>15</b>
1.5.1 Initialer Kontakt zur Wirtszelle durch den Fiberknopf .....	<b>15</b>
1.5.2 Pentonbasis-vermittelte Endozytose .....	<b>15</b>
1.5.3 Die RGD-Domäne der Pentonbasis .....	<b>17</b>
1.5.4 Replikation .....	<b>18</b>
1.6 Klinische Bedeutung der Adenoviren .....	<b>19</b>
1.7 Nachweismethoden .....	<b>22</b>
1.8 Adenovirus-basierte Vektoren in der Gentherapie .....	<b>23</b>
1.9 Zielsetzung der Arbeit .....	<b>24</b>
<b>2 MATERIAL</b> .....	<b>26</b>
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	<b>26</b>
2.2 Enzyme .....	<b>27</b>
2.3 Kits .....	<b>28</b>
2.4 Oligodesoxynukleotide (Primer) .....	<b>28</b>
2.5 Puffer und Lösungen .....	<b>28</b>
2.6 Zellen, Viren, Bakterien und Vektoren .....	<b>29</b>
2.7 Medien und Platten .....	<b>30</b>

<b>3 METHODEN</b> .....	<b>32</b>
3.1 Gewinnung der Virus-DNA .....	<b>32</b>
3.2 Isolierung und Amplifikation des die Ad 8-Pentonbasis kodierenden DNA-Abschnittes .....	<b>33</b>
3.2.1 Enzymatischer Restriktionsverdau der Ad 8-DNA .....	<b>34</b>
3.2.2 Extraktion der DNA .....	<b>34</b>
3.2.3 Vorbereitung des Vektors pBluescript II KS+ .....	<b>35</b>
3.2.4 Ligation der viralen DNA mit dem Vektor .....	<b>35</b>
3.2.5 PCR zur Amplifikation des Pentonbasis-Gens .....	<b>35</b>
3.3 Sequenzierung des Pentonbasis-Gens .....	<b>38</b>
3.3.1 Einklonierung der amplifizierten Penton-DNA in den Vektor pUC 18 .....	<b>38</b>
3.3.2 Transformation des rekombinanten Plasmids .....	<b>40</b>
3.3.3 Plasmidpräparation .....	<b>40</b>
3.3.4 Kontrolle der Plasmid-DNA mittels Restriktionsanalyse .....	<b>41</b>
3.3.5 Sequenzierung der Pentonbasis-DNA .....	<b>41</b>
3.3.6 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese .....	<b>44</b>
3.4 Mutation des Pentonbasis-Gens .....	<b>45</b>
3.4.1 Einklonierung des Pentonbasis-Gens in den Expressionsvektor .....	<b>45</b>
3.4.2 Austausch einzelner Aminosäuren .....	<b>46</b>
3.4.3 Konstruktion eines verkürzten Pentonbasis-Proteins .....	<b>50</b>
3.4.4 Herstellung mit Deletionen versehener Pentonbasis-Proteine .....	<b>51</b>
3.4.5 Transformation der mutierten Pentonbasis-DNA .....	<b>52</b>
3.5 Expression der Pentonbasis-Proteine .....	<b>53</b>
3.6 Verifikation der exprimierten Proteine .....	<b>54</b>
3.6.1 SDS-PAGE .....	<b>54</b>
3.6.2 Western-Blot .....	<b>55</b>
3.7 Infektion von Zellkulturen .....	<b>56</b>

<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>57</b>
4.1 Die Sequenz der Ad 8-Pentonbasis .....	<b>57</b>
4.2 Vergleich der Aminosäure-Sequenz verschiedener Ad-Serotypen .....	<b>59</b>
4.3 Expression der rekombinanten Pentonbasis-Proteine .....	<b>61</b>
4.4 Mit dem frühen CPE assoziierte Domänen der Pentonbasis .....	<b>63</b>
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>70</b>
5.1 Die RGD-Domäne der Ad 8-Pentonbasis .....	<b>70</b>
5.2 Alternative Domänen .....	<b>73</b>
5.3 Mögliche Konsequenzen für die Weiterentwicklung von Adenovirus-basierten Vektoren .....	<b>74</b>
5.3.1 Gegenwärtige Problematik der Ad-basierten Gentherapie .....	<b>74</b>
5.3.2 Retargeting .....	<b>77</b>
5.3.3 Strategien zur Reduktion der Immunogenität .....	<b>82</b>
5.4 Abschließende Betrachtung .....	<b>83</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>84</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>86</b>
<b>8 LEBENSLAUF</b> .....	<b>101</b>
<b>9 ERKLÄRUNG</b> .....	<b>102</b>
<b>10 PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>103</b>
<b>11 DANKSAGUNG</b> .....	<b>104</b>

**VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN**

AS:	Aminosäure(n)
Abb.:	Abbildung
Ad:	Adenovirus/-en
ATP:	Adenosintriphosphat
Bp:	Basenpaare
Bq:	Becquerel
°C:	Grad Celsius
ca.:	circa
CD:	Cluster of Differentiation
CF:	Cystic Fibrosis, Zystische Fibrose
CPE:	cytopathischer Effekt
D:	Dalton
dATP:	Desoxyadenosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O:	zweifach destilliertes Wasser
ddNTP:	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EGF:	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMBL:	Europäisches Molekularbiologisches Laboratorium
et al.:	und andere
Fab:	Fragment antigen binding, das Antigen bindender Teil eines Antikörpers
h:	Stunde(n)
HA:	Hämagglutination
HAH:	Hämagglutinationshemmung
Ig:	Immunglobulin

KBR:	Komplementbindungsreaktion
KCE:	Keratokonjunctivitis epidemica
kD:	Kilodalton
M:	Molarität
mA:	Milliampere
MCS:	Multiple Cloning Site
MHC:	Major Histocompatibility Complex
g:	Mikrogramm
l:	Mikroliter
min:	Minute(n)
ml:	Milliliter
MLP:	Major Late Promotor
mRNA:	messenger-Ribonukleinsäure
ng:	Nanogramm
nm:	Nanometer
OD:	Optische Dichte
PCR:	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
RT:	Raumtemperatur
SDS:	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE:	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec:	Sekunde(n)
Tab.:	Tabelle
TEMED:	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer:	Tris-EDTA-Puffer
Tris:	Trishydroxymethylaminomethan
U:	Units
u. a.:	unter anderem
Upm:	Umdrehungen pro Minute
UV:	Ultraviolett
V:	Volt



W:	Watt
w/v:	Gewicht pro Volumen
z. B.:	zum Beispiel
z.T.:	zum Teil

### **Abkürzung der proteinogenen Aminosäuren:**

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Entdeckung der Adenoviren

Im Jahr 1953 gelang es Rowe und seinen Mitarbeitern am nationalen Gesundheitsamt in Washington, aus von Kindern exzidierten Rachenmandeln ein Zellkulturen zerstörendes Agens zu isolieren. Der mutmaßliche Erreger wurde zunächst »adenoid-degenerating (AD-)agent« genannt (Rowe et al., 1953).

Morphologisch gleiche degenerative Zellveränderungen wurden wenig später von Hilleman und Werner beobachtet, die Rachenspülmaterial von an einem akuten respiratorischen Infekt erkrankten Militärrekruten untersuchten (Hilleman und Werner, 1954).

Das isolierte auslösende Agens wurde vorläufig als »respiratory illness (RI-) agent« bezeichnet, später als Virus identifiziert und in der Folge »acute respiratory disease virus (ARD)« oder »adenoid pharyngeal conjunctival virus (APC)« genannt.

1956 wurde für den Erreger die Bezeichnung Adenovirus (Ad) eingeführt (Enders et al., 1956). In den folgenden Jahren gelang es, weitere, aufgrund eines gemeinsamen Gruppenantigens miteinander verwandte, humane Ad-Serotypen zu isolieren.

Zunächst wurden Adenoviren als Auslöser von Erkrankungen des Respirationstraktes und der Augen bekannt, im Laufe der folgenden Jahre konnten dann auch Serotypen nachgewiesen werden, die Erkrankungen des Urogenitaltraktes verursachen. Noch später wurden auch Adenoviren gefunden, welche mit Gastroenteritiden sowie mit Infektionen von Patienten mit Defekten des Immunsystems assoziiert sind.

Nachdem entdeckt wurde, daß einige Ad-Serotypen in Nagetieren maligne Tumoren auszulösen vermögen, rückten Adenoviren und insbesondere ihre Replikation und Onkogenese ins Interesse der molekularen Genetik, auch wenn sich später herausstellte, daß sie in der humanen Kanzerogenese keine Rolle spielen. Basierend auf dem Studium der Adenoviren konnten wichtige Grundlagen erforscht werden, so das Splicing von RNA-Transkripten sowie die Rolle von Proteinen als Initiatoren der DNA-Replikation (Wadell, 1990 a).

## 1.2 Klassifikation

Adenoviren gehören zu den hüllenlosen DNA-Viren. Seit 1976 werden sie als Familie der Adenoviridae mit den beiden Genera Mast- und Aviadenovirus bezeichnet (Norrby et al., 1976). Das Genus Mastadenovirus umfaßt die Adenoviren der Menschen und Säugetiere, das Genus Aviadenovirus die bei Vögeln nachgewiesenen Adenoviren. Derzeit sind 51 humane Serotypen bekannt.

Humane Adenoviren wurden erstmals von Rosen aufgrund ihres unterschiedlichen Verhaltens in der Agglutination von Rhesusaffen- und Ratten-Erythrozyten in drei Gruppen eingeteilt (Rosen, 1958). Auch die von Huebner vorgenommene Einstufung der humanen Adenoviren, basierend auf ihrer Fähigkeit, in neugeborenen Hamstern Tumoren zu induzieren (Huebner, 1967), führte zu einer Einteilung in drei Gruppen, die in Übereinstimmung mit der Einteilung von Rosen stand. Als weiteres Kriterium für eine Einteilung der humanen Adenoviren wurde der Guanin-/Cytosin-Gehalt der viralen DNA für eine Einteilung herangezogen (Pina und Green, 1956).

Heute werden humane Adenoviren vorrangig anhand ihres Verhaltens in der Neutralisation und Hämagglutinationshemmung, ihrer Hämagglutinationsaktivität, sowie zunehmend mittels DNA-Restriktionsanalyse (Adrian et al., 1986) in die sechs Subgenera A–F eingeteilt. Darüber hinaus werden noch weitere Einteilungskriterien verwendet, hierzu zählen u.a. morphologische (Fiberlänge), biochemische (DNA-Homologie) und immunologische Eigenschaften.

Durch vergleichende Sequenzanalysen wurde unlängst entdeckt, daß die Genome einiger Ad-Serotypen einen auffallend hohen Gehalt an Adenin und Thymin aufweisen (Harrach et al., 1997). Es wurde vorgeschlagen, diese Adenoviren, welche in beiden bisherigen Genera zu finden sind, einem neuen, dritten Genus »AT-adenovirus« zuzuordnen.

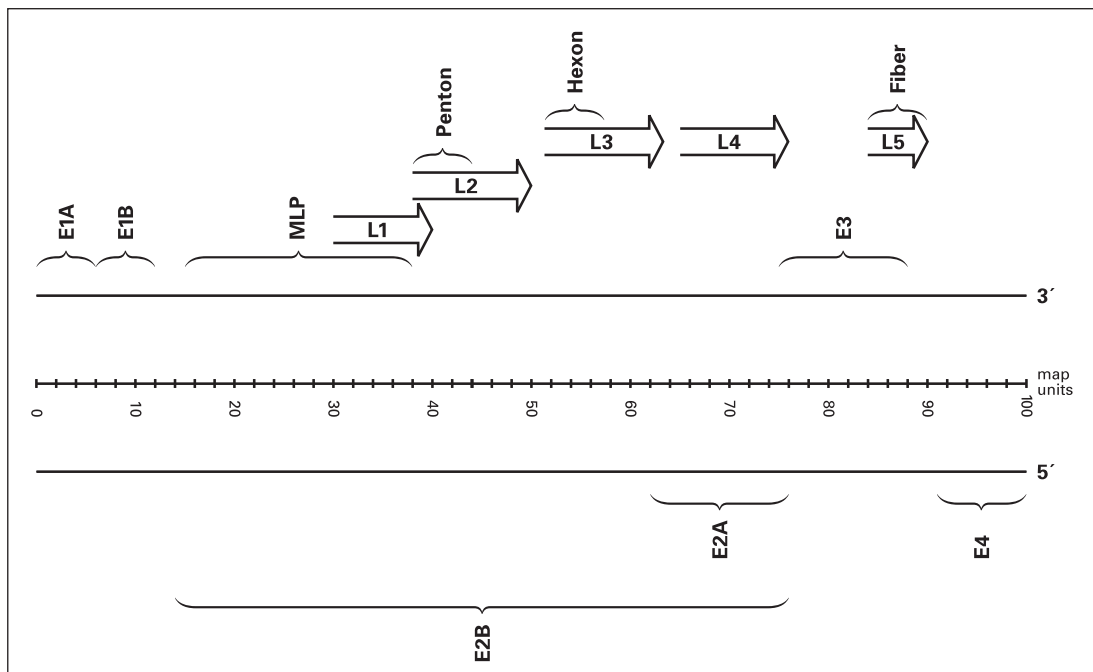
Subgenus	Serotyp	Fiberlänge [nm]	DNA			Hämagglutinationsverhalten
			Homologie [%]	G/C-Gehalt [%]	Anzahl an Sma I-Fragmenten	
<b>A</b>	12, 18, 31	28 – 31	48 – 69	47 – 49	4 – 5	Ratte (inkomplett)
<b>BI</b>	3, 7, 16, 21, 50	9 – 11	89 – 94	50 – 52	8 – 10	Affe (komplett)
<b>BII</b>	11, 14, 34, 35					
<b>C</b>	1, 2, 5, 6	23 – 31	99 – 100	57 – 59	10 – 12	Ratte (inkomplett)
<b>DI</b>	8, 9, 10, 13, 19, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51	12 – 13	95 – 97	57 – 60	14 – 18	Ratte (komplett) und Mensch
<b>DII</b>	15, 17, 22, 23, 24, 29, 30, 32, 33					Ratte (komplett)
<b>DIII</b>	20, 25, 28					atypisch
<b>E</b>	4	17		57	19	Ratte (inkomplett)
<b>F</b>	40, 41	28 – 33			9 – 11	Ratte (inkomplett)

**Tab. 1:** Einteilung der humanen Adenovirus-Serotypen in die Subgenera A–F (modifiziert nach Wadell, 1990 b).

### 1.3 Organisation des Genoms

Das Genom der Adenoviren besteht aus linearer doppelsträngiger DNA mit einem Molekulargewicht von 20–25 000 kD, entsprechend etwa 30 000–38 000 Basenpaaren (Gingeras et al., 1982). Zwei Core-Proteine geben der DNA eine chromatinähnliche Struktur (Everitt et al., 1973). Das Genom ist in frühe und späte Transkriptionseinheiten organisiert. Durch jede der sechs frühen Transkriptionseinheiten werden verschiedene mRNAs generiert, deren kodierte Polypeptide zur viralen Replikation, Transformation und Latenz in der infizierten Zelle benötigt werden. Die späten Transkriptionseinheiten kodieren vor allem die Strukturproteine des Virions (Sussenbach, 1984; Horwitz et al., 1990). Die Zerlegung der Vorläufer-mRNA in kleinere, die einzelnen Strukturproteine kodierenden Segmente, findet durch Spleißen statt. Darauf folgt eine Polyadenylierung am 3'-Ende und das Anhängen einer »Cap«-Struktur am 5'-Ende (Berget et al., 1977; Chow und Broker, 1978; Akusjärvi et al., 1986).

Die folgende Abbildung zeigt die Lokalisation der verschiedenen Transkriptionseinheiten des Adenovirus-Genoms am Beispiel von Ad 2.

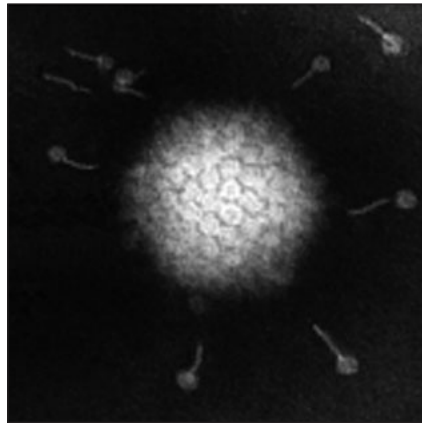


**Abb. 1:** Funktionelle Karte des Adenovirus-Genoms (modifiziert nach Sussenbach, 1984). Darstellung der für spezifische mRNAs kodierenden Regionen des Ad-Genoms. Die Transkription verläuft in 5'-3'-Richtung.

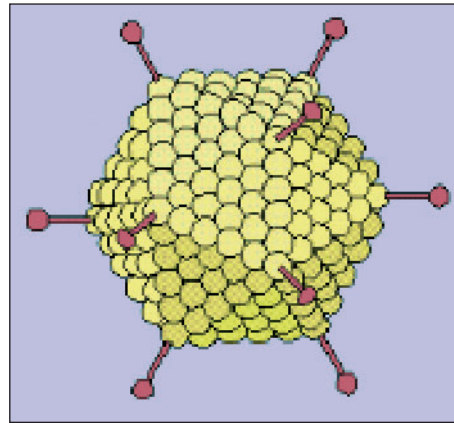
Die Regionen unterteilen sich aufgrund der Reihenfolge ihrer Transkription in drei Gruppen. Frühe Regionen sind E1A, E1B, MLP, E3, E4 und E2A. Intermediäre Regionen sind E2B und Anteile von E2A und E1B. Späte Regionen sind L1–L5.

#### 1.4 Morphologie des Adenovirions

Das Adenovirus stellt sich elektronenmikroskopisch als ein Ikosaeder mit einem Durchmesser von 60–90 nm dar. Der elektronendichtere zentrale Kern wird von der DNA und den Core-Proteinen gebildet. Er ist vom Kapsid, einer Proteinhülle aus 252 Kapsomeren umgeben (Ginsberg et al., 1966; Norrby, 1969; Wigand et al., 1982). 240 Hexone bilden die Flächen und Kanten der 20 Dreiecke des Ikosaeders, die 12 Pentone nehmen die Eckpunkte der Dreiecke ein. An jeder Pentonbasis inseriert eine antennenartige Fiber, welche eine Verdickung an ihrem freien Ende, den Fiberknopf, aufweist und dem Virion das charakteristische, an einen Satelliten älterer Bauart erinnernde Erscheinungsbild verleiht (Horne et al., 1959; Horwitz et al., 1969; Boudin und Boulanger, 1982; Nermuth, 1984; Wadell, 1990 b).



**Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Adenovirions (Stannard, 1998). Die Fiberproteine lösen sich bei der Präparation oft von der Pentonbasis.



**Abb 3:** Modell der Kapsidstruktur nach Stannard, 1998.

Die Kapsidproteine sind als Träger der antigenen Determinanten für die immunologischen Reaktionen der Adenoviren verantwortlich.

Protein	Polypeptid	Bezeichnung des Epitops	Spezifität	Anmerkungen	Nachweis
Hexon	II	$\alpha$	Genus	lokalisiert im Inneren des Virions	KBR, ELISA
		$\epsilon$	Serotyp	auf der Oberfläche	Neutralisation
Pentonbasis	III	$\beta$	Genus	Toxin-ähnliche Wirkung	indirekte HA, HA-Enhancement
Fiber	IV	$\gamma$	Serotyp	auf der Fiber lokalisiert	HA, HAH
		$\delta$		nur Subgenera C und D	

**Tab. 2:** Lokalisation und Eigenschaften der wichtigsten Antigenstrukturen von Adenoviren (modifiziert nach Wadell, 1990 a).

Das Hexon, ebenso wie das Penton benannt nach der Anzahl der ihm benachbarten Kapsomere, setzt sich aus drei Ketten des Polypeptids II zusammen (Horwitz et al., 1969; Boudin et al., 1980). Jedes Hexonpolypeptid weist vier Schleifen auf, die durch  $\beta$ -Faltblattstrukturen verbunden sind (Athappilly et al., 1994). Das Hexon trägt das  $\alpha$ -Antigen, eine gruppenspezifische Determinante, die diagnostisch mittels KBR und ELISA nachgewiesen werden kann. Die Antigen determinante  $\epsilon$  ist ebenfalls auf dem Hexon lokalisiert, gemeinsam mit dem typspezifischen  $\gamma$ -Antigen des Fiberknopfes bestimmt sie die Serotyp-Spezifität des Adenovirus (Eiz und Pring-Åkerblom, 1997).

Die Pentonbasis besteht aus fünf Kopien des Polypeptids III (Wigand et al., 1982; van Oostrum und Burnett, 1985; Karayan et al., 1994). Sie ist Träger der gruppenspezifischen Antigen determinante  $\beta$  (Pettersson und Hoeglund, 1969; Ginsberg, 1984). Während der Fiberknopf das initiale Andocken des Virions an zelluläre Rezeptoren der Wirtszelloberfläche vermittelt (Chardonnet und Dales, 1970; Louis et al., 1994), ist die Pentonbasis vor allem in die Phase der Virusinternalisation mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose und die nachfolgende Freisetzung der Virionen aus den zellulären Endosomen involviert (siehe unten).

Das der Anheftung des Virus an spezifische Rezeptoren der Wirtszelloberfläche zu Beginn der Infektion dienende Fiberprotein besteht aus drei Polypeptiden IV (van Oostrum und Burnett, 1985; Ruigrok et al., 1990). Die Fiber ist verantwortlich für die Agglutination von Erythrozyten und besitzt drei antigene Determinanten (Eiz und Pring-Åkerblom, 1997). Die Antigen determinante  $\gamma$  ist typenspezifisch und bestimmt zusammen mit der  $\epsilon$ -Determinante des Hexons den Serotyp. Für die Ad der Subgenera C und D wurde noch eine intersubgenusspezifische Determinante  $\delta$  beschrieben (Norrby, 1969). Außerdem befindet sich auf der Fiber eine subgenusspezifische Determinante (Pettersson und Hoeglund, 1969). Die Fiber unterteilt sich in drei strukturelle Domänen. Die konservierte N-terminale Schwanzregion ist nicht-kovalent mit der Pentonbasis assoziiert. Der stabförmige Schaft von variabler Länge enthält Wiederholungen einer 15 Aminosäuren- $\beta$ -Faltblattstruktur. Die Anzahl der Wiederholungen und die daraus resultierende Gesamtlänge der Fiber variieren beträchtlich zwischen verschiedenen Serotypen. Eine konservierte Aminosäuresequenz markiert die Grenze zwischen den sich wiederholenden Einheiten des Schaftes und der globulären Knopfdomäne, einem Homotrimer von 21kD-Untereinheiten. Der Fiberknopf weist eine einem dreiblättrigen Propeller ähnelnde Struktur auf. Jedes Knopfmonomer ist als zehnrängige, antiparallele  $\beta$ -Sandwich-Struktur, verbunden durch  $\alpha$ -helikale Schleifen, organisiert (Stouten et al., 1992; Henry et al., 1994; Pring-Åkerblom und Adrian, 1995; Pring-Åkerblom et al., 1996; 1997; 1998; Santis et al., 1999; Kirby et al., 2000).

## **1.5 Infektion**

### **1.5.1 Initialer Kontakt zur Wirtszelle durch den Fiberknopf**

Adenoviren verschaffen sich Zutritt zu ihren Wirtszellen durch Rezeptorvermittelte Endozytose. Initiiert wird der Zelleintrittspfad der Adenoviren in der Regel durch das Anheften des Fiberknopfes an einen Rezeptor der Wirtsoberfläche (Defer et al., 1990). Zwei unterschiedliche Grundtypen primärer zellulärer Rezeptoren konnten bisher bei Ad identifiziert werden: der Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) (Bergelson et al., 1997; Tomko et al., 1997; Roelvink et al., 1996, 1998) und die MHC-1- $\alpha$ 2-Domäne (Hong et al., 1997). Während der Coxsackie- und Adenovirusrezeptor, ein 46 kD großes, transmembranöses Protein, die Bindung der Fiber der Subgenus A, C, D, E und F vermittelt, wird vermutet, daß die MHC-1- $\alpha$ 2-Domäne eine Rolle beim Kontakt mit Zellen spielt, die keine oder nur geringe Mengen des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zusätzlich konnte mit Sialinsäure noch ein weiterer Rezeptor, der von Ad 8, 19a und 37 (Subgenus D), den Erregern der KCE, verwendet zu werden scheint, identifiziert werden (Arnberg et al., 2000 a,b; 2002 a,b). Adenoviren des Subgenus B binden offenbar Coxsackie- und Adenovirusrezeptor-unabhängig an ihre Wirtszellen, ein entsprechender alternativer Rezeptor konnte bisher nicht sicher identifiziert werden (Roelvink et al., 1998), für den Serotyp 11 wird vermutet, daß CD 46 einem zellulären Rezeptor entsprechen könnte (Segerman et al., 2003).

### **1.5.2 Pentonbasis-vermittelte Endozytose**

Die nachfolgenden Infektionsschritte werden durch Interaktionen der Pentonbasis mit Integrinen der Wirtszellmembran vermittelt.

Die Aminosäure-Sequenz des Pentonbasis-Proteins ist innerhalb eines Subgenus hochkonserviert. Den Pentonbasen der humanen Serotypen, deren Aminosäure-Sequenz bekannt ist, ist gemein, daß sie zwei Regionen hoher Homologie aufweisen, die durch eine nicht-homologe Region variabler Länge getrennt sind, die bei vielen Serotypen ein konserviertes RGD (Arginin-Glycin-Aspartat)-Motiv einschließt (Cuzange et al., 1994; Karayan et al. 1997). Die



Länge dieser hypervariablen Region variiert von 22 (Ad 12) bis 80 Aminosäuren (Ad 2) (Stewart et al., 1997).

Während des endozytotischen Eindringens des Adenovirus in die Wirtszelle wird der Interaktion dieser konservierten RGD-Motive mit Integrinen der Zelloberfläche (siehe unten) entscheidende Bedeutung beigemessen (Bai et al., 1993, 1994; Belin und Boulanger, 1993; Wickham et al., 1993, 1994; Hong et al., 1997; Chroboczek et al., 2003).

Integrine sind transmembranöse, heterodimere Glykoproteine, die via Aktivierung von Signaltransduktionspfaden in die Abläufe verschiedenster Zellvorgänge involviert sind, einschließlich Entzündung, Wundheilung, Funktionen des Immunsystems sowie der Kommunikation von Zellen untereinander. Eine qualitativ oder quantitativ veränderte Expression von Integrinen ist zudem assoziiert mit Wachstum und Metastasierung maligner Tumoren. Zudem bedienen sich eine Reihe viraler und bakterieller Pathogene der Integrine, um Zutritt zu Wirtszellen zu erlangen.

Es konnten auf humanen Zellen bisher etwa 20 unterschiedliche Integrin-Typen nachgewiesen werden. Sie setzen sich zusammen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die Kombination verschiedener  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten determiniert die Spezifität der Ligandenbindung jedes Integrins. Die auf der Zelloberfläche gelegenen Integrin-Anteile bilden Rezeptoren für Fibronectin, Kollagen und andere extrazelluläre Liganden, die innerhalb der Zelle gelegenen Anteile sind mit dem Zytoskelett verankert.

Viele Integrine erkennen die RGD-Sequenz, so die Integrine  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_M\beta_2$  sowie die meisten, evtl. sogar alle  $\alpha_v$ -Integrine, auf jeden Fall die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ . Das RGD-Triplet findet sich unter anderem in Fibronectin, Vitronectin und einer Vielzahl weiterer Zelladhäsionsproteine. Andere Integrine weisen andere spezifische Bindungssequenzen auf, so z.B. das Integrin  $\alpha_2\beta_1$  die Sequenz DGEA (Aspartat-Glycin-Glutamat-Alanin) und das Integrin  $\alpha_4\beta_1$  die Sequenz EILDV (Glutamat-Isoleucin-Leucin-Aspartat-Valin) (Hynes, 1992; Wickham et al., 1993, 1995; Diamond und Springer, 1994;

Ruoslahti, 1996; Varner und Cheresch, 1996; Horwitz, 1997; Karayan et al., 1997; Li et al., 1998).

Für Ad 2 ist bekannt, daß es nach dem initialen Andocken an die Wirtzelle über die pentavalente RGD-Sequenz des Pentonbasis-Proteins an die Zelloberflächenintegrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  bindet. Diese Bindung kann durch lösliche, synthetische RGD-Peptide sowie durch Antikörper, gerichtet gegen funktionelle Domänen der Integrine, inhibiert werden (Varga et al., 1991; Wickham et al., 1993).

### **1.5.3 Die RGD-Domäne der Pentonbasis**

Die wahrscheinliche sekundäre Struktur der RGD-Domäne entspricht einer Konfiguration aus zwei  $\alpha$ -Helices, die durch eine das RGD-Tripeptid tragende  $\beta$ -Schleife verbunden sind. Die Helices bestehen größtenteils aus hydrophilen Aminosäuren, hinweisend darauf, daß die RGD-Domäne sich an exponierter Stelle auf der Oberfläche des Viruspartikels befindet (Hynes et al., 1992; Main et al., 1992; Mathias et al., 1994). Elektronenmikroskopische Studien unterstützen dieses Modell, sie enthüllten unlängst die Existenz von ca. 2nm durchmessenden Protrusionen auf der äußeren Oberfläche der Pentonbasis. Es wird vermutet, daß diese exponierten Protrusionen das RGD-Motiv enthalten. Die RGD-Integrin-Bindungsstelle befindet sich also mit großer Wahrscheinlichkeit an der Spitze eines hochmobilen Oberflächenloops, diese Mobilität ermöglicht bzw. erleichtert offenbar die Interaktion mit Zellintegriren (Stewart et al., 1997; Chiu et al., 1999).

Es ist nicht genau bekannt, wie viele bzw. welche der 51 bisher bekannten humanen Adenoviren eine RGD-Sequenz in ihrer Pentonbasis aufweisen. Einigen Serotypen, z. B. Ad 40 und 41 (Subgruppe F), fehlt dieses Motiv, sie weisen stattdessen Variationen wie RGAD oder IGDD auf und sind somit offenbar unabhängig von der durch die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  vermittelten Endozytose (Albinsson und Kidd, 1999). Das Fehlen des RGD-Tripeptids schließt aber die Involvierung von Integriren nicht aus, weil auch andere Sequenzen eine Integrin-Bindung vermitteln können. Außer in Adenoviren

findet sich das RGD-Motiv auch in Kapsidproteinen einer Reihe anderer Viren (unter anderem Coxsackie-, HI- und Herpes simplex-Viren) (Dmitriev et al., 1998).

Die  $\alpha_v$ -Integrine der Zelloberfläche spielen offenbar eine zentrale Rolle beim Eintritt von Adenoviren in ihre Wirtszellen. Zellen, denen diese Rezeptoren fehlen bzw. die diese nur in geringem Umfang exprimieren, sind signifikant weniger empfänglich für Ad-Infektionen. Funktionsblockierende monoklonale Antikörper gerichtet gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  verhindern die Virusinternalisation (Mathias et al, 1994, 1998). Mutierte Ad, die statt des RGD-Triplets des Pentonbasis-Proteins eine veränderte Sequenz aufweisen, zeigen eine deutlich verringerte Fähigkeit, an  $\alpha_v$ -Integrine zu binden und sind weniger infektiös (Bai et al, 1993; Huang et al., 1995).

Die Interaktion des RGD-Motivs der Ad-Pentonbasis mit den  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen der Wirtszelloberfläche vermittelt die endozytotische Internalisierung des Virions. Innerhalb des endosomalen Vesikels durchlaufen die Virionen dann einen schrittweisen Zerlegungsprozeß. Die Virusinternalisierung scheint durch Bindung an  $\alpha_v\beta_3$ - oder  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine getriggert zu werden, während die Permeabilisierung der Zellmembran bzw. das Entkommen der Virionen aus den Vesikeln offenbar ein Resultat der selektiven Interaktion der Pentonbasis mit  $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen ist (Wickham et al., 1993, 1994; Karayan et al., 1997; Stewart et al., 1997; Chiu et al., 1999). Anschließend erfolgt der Transport der viralen DNA zum Kern der Wirtszelle.

#### **1.5.4 Replikation**

Unmittelbar nach Eintritt der viralen DNA in den Zellkern beginnt die Transkription der mRNAs für die frühen Proteine. Eine Reihe von frühen Nicht-Strukturproteinen wird translatiert, bevor das virale Genom repliziert werden kann. Im Anschluß an die Replikation des Genoms werden die späten Transkriptionseinheiten, die Strukturproteine, exprimiert. Die Virionen werden im Nucleus der Wirtszelle zusammengesetzt und bilden dort elektronenmikroskopisch nachweisbare kristalline Aggregate (Wadell, 1990 b).

## **1.6 Klinische Bedeutung der Adenoviren**

Durch humane Adenoviren werden die unterschiedlichsten Organsysteme befallen. Die häufigsten Adenovirusinfektionen betreffen den Respirationstrakt, gefolgt von Infektionen des Gastrointestinaltraktes und des Auges (Horwitz, 1985; Wigand und Adrian, 1986). Etwa 50 % der Infektionen verlaufen subklinisch und ohne Ausbildung charakteristischer Symptome, nur wenige der 51 bisher bekannten Serotypen können eindeutig mit Erkrankungen assoziiert werden.

Kinder sind die mit etwa 75 % am häufigsten betroffene Patientengruppe (Brandt et al., 1969; Fox et al., 1977; Schmitz et al., 1983). Ungefähr fünf Prozent der Erkrankungen des Respirationstraktes von Kleinkindern sind auf eine Infektion durch Adenoviren zurückzuführen, hauptsächlich durch Serotypen des Subgenus B. Nach den RS (respiratory syncytial)- und den Parainfluenzaviren sind Adenoviren die am häufigsten isolierten Viren des Respirationstraktes bei Kleinkindern. Bei Säuglingen kommen schwer verlaufende Bronchopneumonien vor, zumeist verursacht durch die Serotypen 3 und 7 (Wadell, 1990 b).

Vor allem bei kasernierten Militärrekruten verursachen Ad 3, 4, 7 und 21 oftmals epidemische Atemwegserkrankungen bis hin zu Bronchopneumonien (Hilleman und Werner, 1954; Huebner et al., 1954; Horwitz, 1990; Wadell, 1990 b). Ad 3 und Ad 7 (Subgenus B) sind auch die Erreger des sogenannten Pharyngokonjunktivalfiebers, welches häufig epidemisch als sogenannte »Swimming pool-Konjunktivitis« auftritt, z. B. in Ferienlagern mit unzureichend gechlorten Schwimmbädern (Huebner et al., 1954; Bell et al., 1955; Horwitz, 1990; Wadell, 1990 b).

Die Erreger der Keratokonjunktivitis epidemica (KCE) sind Adenoviren des Subgenus D. Die Infektion wurde erstmalig 1941 als »Shipyard eye« bei Industriearbeitern im Westen der USA beschrieben. Bis etwa 1973 galt Ad 8 als alleiniger Hauptauslöser, von 1973 bis 1976 wurde vor allem Ad 19 nachgewiesen. 1976 konnte erstmalig der Serotyp 37 identifiziert werden, der sich weltweit ausbreitete und heute gemeinsam mit Ad 8 als hauptsächlicher

Erreger gilt. Die hoch infektiöse KCE wird durch direkten Kontakt übertragen, besonders empfindlich sind mechanisch vorgeschädigte Augen. Zu kleinen Epidemien kann es durch kontaminiertes augenärztliches Instrumentarium (z. B. Tonometer oder Spülflüssigkeiten) kommen (Jawetz et al., 1955; Guyer et al., 1975; Horwitz, 1990; Wadell, 1990 b).

Ad40 und Ad41 (Subgenus F) werden häufig bei Kindern mit Gastroenteritiden gefunden (Wadell et al., 1994), nach den Rotaviren sind sie die häufigsten viralen Durchfallerreger bei Kleinkindern. Eine enterische Infektion durch Adenoviren des Subgenus C wird als ein möglicher Auslöser des Invaginationsileus von Kleinkindern diskutiert (Wadell, 1990 b). Cervicitis und Urethritis sind die Manifestationen einer venerischen Infektion mit Ad37 (Swenson et al., 1995). Ad11, seltener auch Ad21, sind potentielle Erreger einer Cystitis, vornehmlich bei Knaben.

Adenoviren sind in der Lage, asymptomatische persistierende Infektionen der Nieren hervorzurufen, Ausscheidungen von Viren im Urin über Monate und Jahre, insbesondere bei immunkompromittierten Patienten, wurden beschrieben (Horwitz, 1990; Wadell, 1990 b). Außerdem werden Adenoviren mit dem plötzlichen Kindstod (Sudden Infant Death Syndrome, SIDS) in Verbindung gebracht, Infektionen des Respirations- oder Intestinaltraktes gelten als mögliche Auslöser (Bajanowski et al., 1996). Des Weiteren werden Adenoviren als Erreger von Myokarditiden bei Kindern beschrieben (Martin et al., 1994). Bei adulten Myokarditispatienten konnten bisher allerdings keine Adenoviren in Endomyokardbiopsien detektiert werden (Grumbach et al., 1996).

Bei immunsupprimierten Patienten ist ein breites Spektrum von Erkrankungen auf Adenoviren zurückzuführen: Respiratorische Erkrankungen (Ljungman et al., 1989), Parotitiden (Gelfand et al., 1994), Hepatitiden (Krilov et al., 1990), Nephritiden (Green et al., 1994), Encephalitiden (Anders et al., 1990) und andere neurologische Erkrankungen (Horoupian et al., 1984). Bei HIV-positiven Patienten dominieren Serotypen und immunologische Varianten der Subgenera B und D (Hierholzer et al., 1988; Khoo et al., 1995; de Jong et al., 1999). Adenoviren des Subgenus B werden häufig in den Urinproben immunkompromittierter

Patienten gefunden. Im Stuhl von AIDS-Patienten wurden viele verschiedene Serotypen, insbesondere des Subgenus D, nachgewiesen, wobei einige dieser Serotypen genetischen Rekombinationen zu entsprechen scheinen. Serotypen des Subgenus C, welche sich durch eine besonders lange Latenz in Lymphgewebe auszeichnen, können bei Immunschwäche reaktiviert werden und sind nicht selten in Blutproben von AIDS-Patienten zu finden. Die meisten Ad-Infektionen des Gastrointestinaltraktes von HIV-positiven Patienten werden ausgelöst durch Serotypen des Subgenus D, welche bisher kaum oder überhaupt nicht bei immunkompetenten oder an anderen Immundefekten erkrankten Patienten nachgewiesen wurden. Die sieben zuletzt isolierten Ad-Serotypen gehören alle zum Subgenus D, einige dieser Serotypen scheinen fast ausschließlich bei AIDS-Patienten vorzukommen (Wadell, 1990 b; De Jong et al., 1999). Einen Überblick über die häufigsten klinischen Manifestationen von Ad-Infektionen und die dominierenden Serotypen vermittelt die folgende Tabelle.

Organsystem	Erkrankungen bzw. Syndrome	Hauptsächliche Erreger (Ad)	Bemerkungen
Respirationstrakt	Verschiedene (Tonsillitis, Pharyngitis, Pneumonie, etc.)	1, 2, 5, 3, 7	endemisch (Kinder)
		4, 7, 21	epidemisch
Auge	Pharyngokonjunktivalfieber	3, 7	epidemisch
	Keratokonjunktivitis epidemica (KCE)	8, 19, 37	Augenarztpraxen
	Follikuläre Konjunktivitis	3, 4, 7	
Gastrointestinaltrakt	Gastroenteritis	40, 41	Kleinkinder
	Darminvagination	1, 2, 3, 5	Kleinkinder
Urogenitaltrakt	Hämorrhagische Cystitis	11, 21	Kleinkinder
	Cervicitis, Urethritis, genitale Ulcera	19, 37	Erwachsene
Sonstige	Immunsuppression	1, 2, 5, 7, 11, 31, 34, 35	Transplantierte, HIV

**Tab. 3:** Klinische Bedeutung der humanpathogenen Adenoviren (modifiziert nach Wadell, 1990 b).

## 1.7 Nachweismethoden

Adenoviren lassen sich u. a. in HeLa- und A 549-Zellen relativ problemlos vermehren. In den Kulturen zeigen sie einen lichtmikroskopisch charakteristischen cytopathischen Effekt (CPE). Ein direkter Nachweis von Adenoviren ist elektronenmikroskopisch möglich. Die charakteristische Morphologie erlaubt eine schnelle und eindeutige Identifikation. Ergänzt durch den Neutralisations-, den Hämagglutinations- und den Hämagglutinationshemmtest ist so in der Regel eine eindeutige Typisierung von Ad-Isolaten möglich, allerdings weisen diese Tests nur indirekt adenovirale Determinanten nach (Wadell, 1990 b). Im Neutralisationstest wird durch Zugabe von Antisera gegen die typenspezifische  $\epsilon$ -Determinante des Hexonproteins ein CPE verhindert (Rowe et al., 1958). Der Hämagglutinationstest nutzt die Fähigkeit bestimmter Adenoviren, Erythrozyten z.B. von Rhesusaffen vollständig (Subgenera B und D) oder teilweise (Subgenera A, C, E und F) zu agglutinieren (Rosen, 1958).

Moderne Methoden des direkten Nachweises sind die DNA-Restriktionsanalyse (Adrian et al., 1986) und die PCR (Pring-Åkerblom et al., 1997, 1999). Die DNA der unterschiedlichen Adenoviren zeigt nach Restriktionsanalyse und elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte ein charakteristisches Bandenmuster, welches zur Identifikation herangezogen werden kann. Bei der PCR-Typisierung werden typenspezifische Regionen des Hexons amplifiziert und dann ebenfalls elektrophoretisch getrennt und analysiert. Beide Methoden weisen die virale DNA, nicht das Virus mit seinen epitopen Strukturen nach, somit sind durch Kontamination mit adenoviraler DNA falsch-positive Resultate möglich. Vorteile dieser Methoden sind jedoch die einfache und schnelle Handhabung sowie die hohe Sensitivität im Vergleich zu den erstgenannten Verfahren.

### **1.8 Adenovirus-basierte Vektoren in der Gentherapie**

Das gute Verständnis der transkriptionalen Vorgänge, die relativ einfache Manipulation des Genoms sowie der hocheffiziente Infektionsmechanismus haben Adenoviren zu einem bedeutsamen Vektor in der Gentherapie werden lassen. Adenoviren besitzen die Fähigkeit, viele unterschiedliche Zelltypen zu infizieren. Insbesondere die Fähigkeit zur Infektion sich nicht teilender Zellen, der Organtropismus gegenüber respiratorischem Epithel sowie die nicht-existente Gefahr der Insertionsmutagenese mit dem Risiko der Induktion maligner Tumoren unterscheiden sie von den ansonsten vornehmlich eingesetzten Retroviren. Das adenovirale Genom wird nicht in das Wirtgenom integriert, die Expression adenoviraler Gene ist nur temporär (Goldman und Wilson, 1995; Block et al., 1997).

Die ersten Versuche der Gentherapie mit Ad-Vektoren begannen um 1990 und betrafen die Cystische Fibrose, eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, bei der ein monogener Defekt in funktionsuntüchtigen Chloridionenkanälen, unter anderem in Lunge und Pankreas, resultiert. Die Folge des entstehenden dehydrierten, zähflüssigen Sekretes sind respiratorische Infektionen, Bronchiektasen sowie eine Pankreasinsuffizienz.

Die adenoviralen Vektoren der ersten Generation basierten auf Ad5, in den eine Expressionskassette mit dem therapeutischen Fremdgen in die E1-Region eingefügt bzw. diese durch sie ersetzt wurde. Eine Replikation des Vektors in der Wirtszelle wurde so ausgeschlossen. Zusätzlich wurde anfänglich die E3-Region deletiert, um die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination mit Wildtyp-Ad zu reduzieren. Diese Vektoren erzielten anfangs zwar einen effizienten Gentransfer, dieser war allerdings aufgrund der induzierten Immunantwort des Wirtes gegen von den infizierten Zellen exprimierte virale und transgene Proteine, sowie gegen die Vektoren selbst, nur von kurzer Dauer. Versuche, die Expression der therapeutischen Gene durch wiederholte Applikation des Vektors zu verlängern, waren nicht erfolgreich (Chartier et al., 1996; Wilson et al., 1996; Block et al., 1997; Romano et al., 1998; Croyle et al., 2001).



Durch Wiedereinführung der E3-Region, die unter anderem wichtige Schutzmechanismen des Virus gegen die Immunabwehr des Wirtes kodiert, konnte bei diesen Ad-Vektoren der zweiten Generation die transgene Expression verlängert und somit die Effizienz deutlich gesteigert werden (Croyle et al., 2001; Doronin et al. 2001). Dennoch weisen Ad-basierte Vektoren noch entscheidende Nachteile auf, die ihren Einsatz in der Gentherapie limitieren. Neben der induzierten Immunantwort ist vor allem der breite Wirtzelltropismus der Adenoviren problematisch und somit die Entwicklung Gewebe-selektiver Vektoren (»Retargeting«) aktuell Gegenstand intensiver Forschung (Einfeld et al., 2001).

### **1.9 Zielsetzung der Arbeit**

Studien vor über 20 Jahren zeigten, daß von Adenoviren infizierte Zellkulturen einen viruskodierten, löslichen Faktor freisetzen, der verursacht, daß die Zellen sich von ihrem Untergrund ab- bzw. aus ihrem Verband loslösen und sich abrunden. Die zelluläre DNA-Replikation und Proteinsynthese werden hierbei allerdings nicht wesentlich tangiert. Nachfolgende Untersuchungen identifizierten diesen, anfangs vermeintlich cytotoxischen Faktor als Pentonbasis-Protein (Boudin et al., 1979; Ginsberg, 1984). Diese Veränderungen werden als früher cytopathischer Effekt (CPE) bezeichnet und treten bereits einige Stunden nach Infektion auf. Der späte cytopathische Effekt hingegen zeigt sich erst Tage nach der Infektion und ist assoziiert mit der Replikation des Virus (Everett und Ginsberg, 1958; Pereira, 1958; Norrby, 1969; Petterson und Hoeglund, 1969; Boudin et al., 1979; Wadell, 1990 a).

Viele Ad-Serotypen weisen in der zentralen hypervariablen Region ihrer Pentonbasis eine RGD-Sequenz auf. Für Ad2 (Subgenus C) konnte demonstriert werden, daß die RGD-Domäne der Pentonbasis für die zellabrundende Aktivität verantwortlich ist. Experimentelle Mutationen, denen diese RGD-Sequenz fehlte, zeigten deutliche Verzögerungen der Virusreplikation bzw. des Beginns der viralen DNA-Synthese (Bai et al., 1993). Die RGD-Domäne findet sich auch in einer Reihe von Integrin-Liganden wie Fibronectin und Vitronectin (Hynes,

1992; Diamond und Springer, 1994; Dmitriev et al., 1998). Es kann angenommen werden, daß während der frühen Infektionsphase die Pentonbasis der Adenoviren und die Zelladhäsionsproteine der Interzellulärmatrix des Wirtes um die Bindungsstellen an den korrespondierenden Integrinen der Wirtszellen konkurrieren. Dies kann in einer Zellabrundung bzw. -loslösung resultieren, wenn die Zelladhäsionsproteine aus der Integrin-Bindung verdrängt werden.

Sowohl Adenoviren des Subgenus C als auch solche des Subgenus D sind in der Lage, den Coxsackie- und Adenovirusrezeptor als primären zellulären Rezeptor zu verwenden. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob auch die Pentonbasis-Proteine der Subgruppen C und D Gemeinsamkeiten in ihren Eigenschaften aufweisen, z.B. ob Subgenus D-Pentonbasen eine RGD-Sequenz aufweisen und einen frühen CPE auslösen.

Als die Studie geplant wurde, waren noch keine Daten bezüglich Subgenus D-Pentonbasen verfügbar, deshalb wurde das Pentonbasis-Gen des Subgenus D I-Serotypen 8 (Ad 8) sequenziert. Ad 8, der Haupterreger der epidemischen Keratokonjunktivitis, wurde ausgewählt, weil er in Zellkulturen einen mikroskopisch deutlichen CPE hervorruft.

Neben dem nativen Ad 8-Pentonbasis-Protein wurden insgesamt noch 28 andere, in ihrer Aminosäure-Sequenz vor, in oder nach der hypervariablen Region variierte, verkürzte bzw. mit Deletionen versehene Ad 8-Pentonbasis-Proteine konstruiert, in E.coli-Derivaten exprimiert und anschließend mit HeLa-Zellen inkubiert. Um zu untersuchen, ob auch die Bindung an andere als  $\alpha_v$ -Integrine einen CPE hervorzurufen vermag, wurde in zwei Mutationen das RGD-Triplet gegen eine alternative, als Integrin-Erkennungsmotiv bekannte Aminosäure-Sequenz ausgetauscht. Durch lichtmikroskopischen Nachweis bzw. Ausbleiben eines CPE sollten so Rückschlüsse auf mit dem frühen CPE assoziierte Domänen der Ad 8-Pentonbasis gezogen werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

5'- $\alpha$ S <sup>35</sup> -dATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
Acrylamide Denaturing Gel Mix	Stratagene, Heidelberg
Agarose Typ II	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	Bio Rad, München
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Anti-Maus-Ig-AP, Fab-Fragmente	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Oxoid, Hampshire
Bacto-Tryptone	Difco Laboratories, Detroit
Bacto-Yeast Extrakt	Oxoid, Hampshire
Benchmark Prestained Protein Ladder	Gibco BRL, Eggenstein
Blueprint Fast-Page Stain	Gibco BRL, Eggenstein
BM Purple AP Substrat	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Bio Rad, München
Dithiothreitol	Serva, Heidelberg
DNA Molecular Weight Marker VI	Boehringer, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol z.A., abs.	J.T. Baker, Deventer
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Gel-Mix 6	Gibco BRL, Eggenstein
Gene Amp dNTPs	Perkin Elmer, Norwalk
Gleitsilan Sigmacote	Sigma, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid)	Gibco BRL, Eggenstein
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
MEM-Pulvermedium	Gibco BRL, Eggenstein
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer
Newborne Calf Serum	Flow Laboratories, Irvine
One-Phor-All-Buffer	Pharmacia, Freiburg
Polaroid Filme Typ 667	Polaroid, Cambridge/USA
Röntgenfilm X-OMAT AR 35x43	Kodak, Stuttgart

Salzsäure	Riedel-de Häen, Seelze
SDS	Bio Rad, München
Sephacryl S-200 High Resolution	Pharmacia, Freiburg
Tetracyclin	Boehringer, Mannheim
Tris	USB, Bad Homburg

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

## 2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP) 5 U/ $\mu$ l	Promega, Heidelberg
T4-DNA-Ligase 4 U/ $\mu$ l	Stratagene, Heidelberg
Taq-DNA-Polymerase 5 U/ $\mu$ l	Boehringer, Mannheim
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) 6 U/ $\mu$ l	Gibco BRL, Eggenstein
T4-Polynukleotid-Kinase 10 U/ $\mu$ l	Gibco BRL, Eggenstein

### Restriktionsenzyme:

Stu I 10 U/ $\mu$ l	Stratagene, Heidelberg
Nhe I 15 U/ $\mu$ l	Stratagene, Heidelberg
PpuMI 2 U/ $\mu$ l	Amersham, Braunschweig
Sac I 15 U/ $\mu$ l	Pharmacia, Freiburg
Sal I 10 U/ $\mu$ l	Gibco BRL, Eggenstein
BamHI 10 U/ $\mu$ l	Gibco BRL, Eggenstein

### 2.3 Kits

T7 Sequencing Kit	Pharmacia, Freiburg
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Düsseldorf
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Düsseldorf
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
DNA Ligation Kit	Stratagene, Heidelberg
Sure Clone Ligation Kit	Pharmacia, Freiburg
QIAexpress RGS-His Antibody	Qiagen, Düsseldorf

### 2.4 Oligodesoxynukleotide (Primer)

Die verwendeten Oligonukleotide für die Herstellung der mutierten Pentonbasis-Gene sowie für deren Sequenzierung wurden von BioTeZ, Berlin und von ARK Scientific, Darmstadt synthetisiert.

### 2.5 Puffer und Lösungen

**PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung), pro Liter:**

- 8,00g NaCl
- 0,20g KCl
- 0,10g MgCl<sub>2</sub>
- 0,13g CaCl<sub>2</sub>
- 1,15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,20g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**10xTBE, pH 8,0, pro Liter:**

- 108,00g Tris
- 55,00g Borsäure
- 9,30g Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O

**Ethidiumbromidlösung, pro 100 ml:**

1 g Ethidiumbromid  
ddH<sub>2</sub>O ad 100 ml

**1% TBE-Agarosegel, pro 100 ml:**

1 g Agarose  
10 ml 10x TBE-Puffer  
5 ml 0,01 M Ethidiumbromidlösung

**1M Tris-HCl, pro Liter:**

121,14 g Tris, mit HCl auf pH 8,0 bzw. 7,5 eingestellt

**2.6 Zellen, Viren, Bakterien und Vektoren**

- Zellen:** *HeLa*, Stamm Saarbrücken
- Viren:** *Ad8*, Prototyp Trim; ATCC (American type culture collection)
- Bakterien:** *E. coli XL 1-Blue Supercompetent Cells*: recA1, endA1, gyrA96, thi, supE44, hsdR17, relA1, lac-(F' proAB, lacIqZM15, Tn10), (TetR), Stratagene, Heidelberg  
*E. coli M 15*: Derivat des K 12-Stammes; recA<sup>+</sup>, uvr<sup>+</sup>, Nal<sup>s</sup>, F<sup>-</sup>, Str<sup>s</sup>, rif<sup>s</sup>, lac<sup>-</sup>, ara<sup>-</sup>, gal<sup>-</sup>, mtl<sup>-</sup>, REP 4-Plasmid, Qiagen, Düsseldorf
- Klonierungsvektoren:** *pBluescript II KS+*: Derivat des pUC 19; colE 1 ori, lacZ, MCS (657–759 Bp), f 1(+/-) ori, amp, polylinker site, T7 promotor, T3 promotor, 2961BP, Stratagene, Heidelberg  
*pUC 18*: Derivat des pBR 322, lacI, lacZ, MCS, lac promotor, amp, 2686 Bp, Pharmacia, Freiburg  
*pQE 32*: Derivat des pDS-Plasmids; DHFR, RBS, MCS (145–187 Bp), 6xHIS, ori, cat, amp, T5 promotor, to terminator, 3462 Bp, Qiagen, Düsseldorf

---

## 2.7 Medien und Platten

---

### LB-Medium, pH7,5, pro Liter:

- 10,00g Bacto-Tryptone
- 5,00g Bacto-Yeast Extrakt
- 10,00g NaCl

### Minimum Essential Medium (MEM) nach Eagle, pro 5 Liter:

- 53,50g MEM-Pulvermedium mit Hanks-Salzen
- 25,50g Pepton aus Lactalbumin
- 2,20g NaHCO<sub>3</sub>

### 2xYT-Medium, pro Liter:

- 16,00g Bacto-Tryptone
- 10,00g Bacto-Yeast Extrakt
- 5,00g NaCl

### SOC-Medium, pro 100 ml:

- 0,20g Bacto-Tryptone
- 0,50g Bacto-Yeast Extrakt
- 0,05g NaCl

Nach dem Autoklavieren wurde hinzugefügt:

- 2 ml Glucose (20 %)
- 1 ml MgCl<sub>2</sub>/ MgSO<sub>4</sub>-Lösung (je 0,5M)

---

**LB-Agar, pro Liter:**

10g Bacto-Tryptone

5g Bacto-Yeast Extrakt

10g NaCl

15g Agar

Anschließend wurden Antibiotika in folgender Menge addiert:

Ampicillin: 50µg/ml (gelöst in ddH<sub>2</sub>O)

Methicillin: 80µg/ml (gelöst in ddH<sub>2</sub>O)

Tetracyclin: 10µg/ml (gelöst in 50 % Ethanol)

Kanamycin: 50µg/ml (gelöst in ddH<sub>2</sub>O)



### 3 METHODEN

#### 3.1 Gewinnung der Virus-DNA

Ad8 wurde einige Passagen in HeLa-Zellen amplifiziert. Die Extraktion der Virus-DNA aus den Zellkulturen wurde nach der Methode von Doerfler durchgeführt (Doerfler, 1969). Die infizierten HeLa-Zellen wurden geerntet und durch Zentrifugation (15 000 Upm, 10 min, 4 °C) sedimentiert. Nach Waschen des Sedimentes mit 5 ml PBS wurde das Zellpellet in 8 ml Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen lysiert. Die zellulären Bestandteile wurden per Zentrifugation (2000 Upm, 15 min, RT) abgetrennt. Der wässrige Virusüberstand wurde in einem Zellulosenitrat-Röhrchen auf CsCl-Kissen (Dichte 1,4 g/cm<sup>3</sup>) geschichtet und mit 0,02 M Tris-HCl, pH 7,5 aufgefüllt. Nach einstündiger Zentrifugation bei 19 000 Upm und 4 °C, die der Virusanreicherung diente, wurde die Virusbande gesammelt. Anschließend folgten drei weitere Gleichgewichtszentrifugationen (36 000 Upm, 16 h, 4 °C). Die die Virionen enthaltende Lösung wurde in Zellulosenitrat-Röhrchen überführt und mit CsCl-Lösung (Dichte 1,15 g/cm<sup>3</sup>) aufgefüllt. Im isopyknischen CsCl-Gradienten wurden die Virionen bis zur Homogenität gereinigt, anschließend als sichtbare, weiße Bande gesammelt. Um das CsCl zu entfernen, wurden die Viruspräparationen gegen TE-Puffer, pH 7,5 bei 4 °C dialysiert. Zur Dissoziation und Proteolyse der Virionen erfolgte eine kombinierte SDS-Pronase B-Verdauung über 30 min bei 37 °C (SDS: 0,5 % w/v, Pronase B 0,5 mg/ml, jeweils Endkonzentration). Die Entfernung noch vorhandener Proteinreste wurde durch eine dreifache Extraktion mit Phenol (pH 7,5) erreicht. Verbliebene Phenolreste wurden durch eine dreimalige Etherextraktion entfernt. Die gewonnene Virus-DNA wurde im zweifachen Volumen Ethanol über Nacht bei -20 °C präzipitiert und abschließend bei 4 °C über Nacht gegen TE-Puffer dialysiert.

### 3.2 Isolierung und Amplifikation des die Ad8-Pentonbasis kodierenden DNA-Abschnittes

Als Voraussetzung für die PCR-Amplifikation des Pentonbasis-Gens wurde die Ad8-DNA in den Bakteriophagen-Vektor pBluescript II KS+ einkloniert.

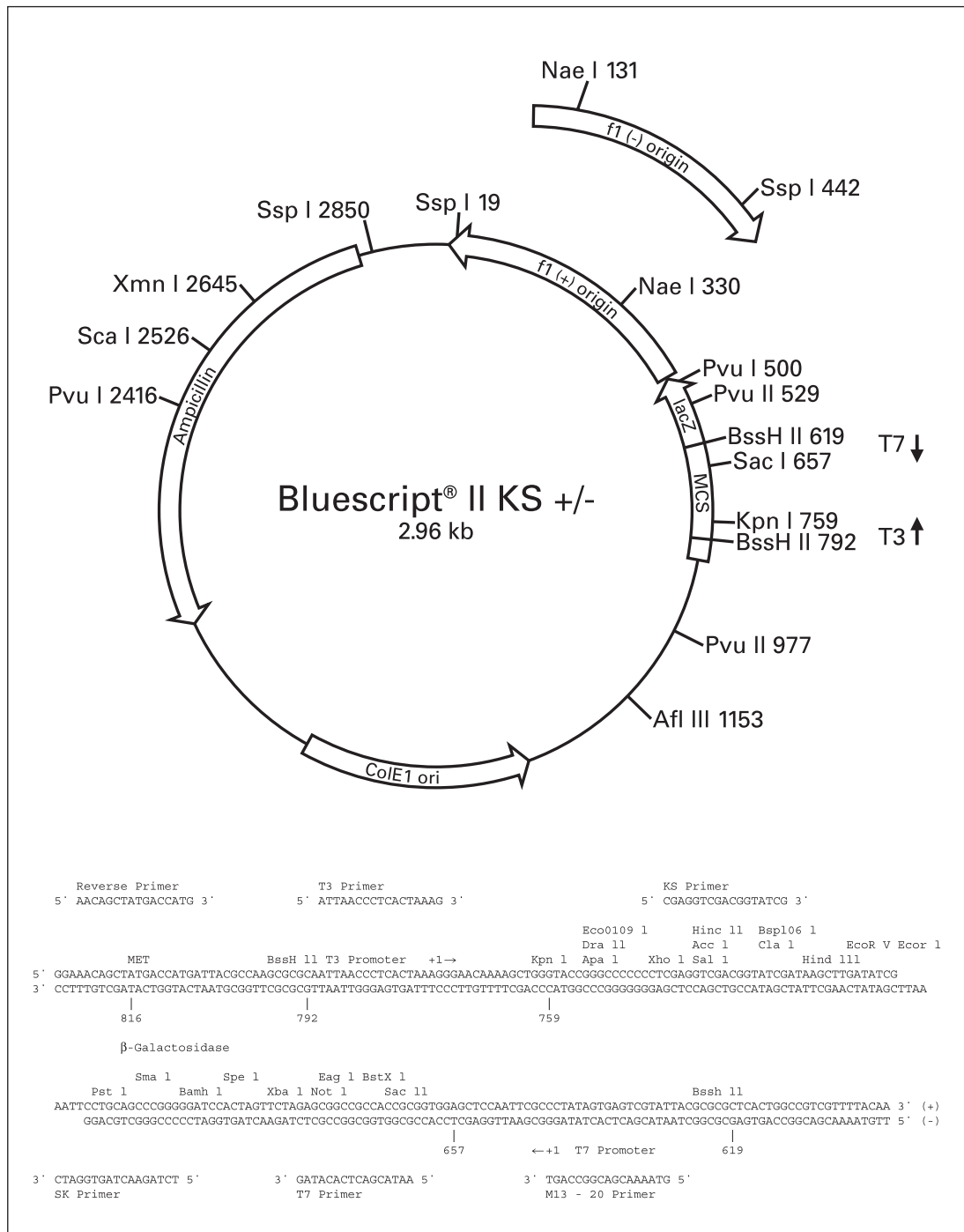


Abb. 4: Schematische Darstellung des Vektors pBluescript II KS+ mit »Multiple Cloning Site« (Katalog Stratagene, Heidelberg).

### **3.2.1 Enzymatischer Restriktionsverdau der Ad8-DNA**

Der für die Pentonbasis kodierende DNA-Abschnitt (Adrian et al., 1990) wurde mit der Restriktionsendonuklease Sal I ausgeschnitten. Der Restriktionsansatz umfasste 7  $\mu$ l Ad8-DNA, 3  $\mu$ l One-Phor-All-Puffer sowie 2  $\mu$ l Sal I Restriktionsenzym und wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 30  $\mu$ l aufgefüllt. Im Anschluß an eine 60 minütige Inkubation bei 37 °C erfolgte der Versatz mit 3  $\mu$ l Stoppuffer zur Inaktivierung des Enzyms. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung und Darstellung in einem 1 %-igen Agarosegel. Durch Zugabe von 5  $\mu$ l Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml Agarosegel konnte das entsprechende DNA-Fragment unter UV-Licht bei 302 nm anhand eines mitgelaufenen Längenstandards identifiziert und ausgeschnitten werden.

### **3.2.2 Extraktion der DNA**

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus TBE-Agarosegelen wurde der QIAEX II Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwandt. Zunächst wurde das Gewicht des ausgeschnittenen Gelstückes bestimmt. Pro 100 mg Gel wurden 300  $\mu$ l Puffer QX 1 und pro 5  $\mu$ g DNA 10  $\mu$ l QIAX II-Silicalgellösung hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde die Agarose über 10 min bei 50 °C im Wasserbad geschmolzen. Durch anschließende Zentrifugation für 30 sec mit 13 000 Upm bei Raumtemperatur wurden die QIAEX-Partikel mit der adsorbierten DNA sedimentiert, der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l Puffer QX 1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation über 30 sec mit 13 000 Upm bei Raumtemperatur folgten zwei Waschvorgänge mit je 500  $\mu$ l Puffer PE. Die gewonnenen Pellets wurden 15 min an der Luft getrocknet und dann in je 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben zentrifugiert (30 sec, 13 000 Upm, Raumtemperatur), anschließend die DNA-haltigen Überstände entnommen und in neue Reaktionsgefäße überführt.

### **3.2.3 Vorbereitung des Vektors pBluescript II KS+**

3 µg (25 µl) des Vektors pBluescript II KS+ wurden in einem 30 µl-Restriktionsansatz mit 20 U (2 µl) des Restriktionsenzym Sall I und 3 µl 10x Inkubationspuffer über 90 min bei 37 °C verdaut. Um eine Religation der Vektor-DNA zu verhindern, wurde diese durch alkalische Phosphatase (Alkaline Calf Intestinal Phosphatase, CIP) dephosphoryliert. Dafür wurden dem Restriktionsansatz mit der geschnittenen Vektor-DNA 5 µl CIP-Puffer und 5 U CIP pro µg Vektor-DNA hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte mit gleicher Gesamtmenge eine Phenol-/Chloroformextraktion und nach 1 min Zentrifugation bei RT und 13 000 Upm die Überführung des DNA-Überstandes auf eine mit 500 µl Sephacryl S-200 präparierte Säule (Sure Clone Ligation Kit, Pharmacia, Freiburg) sowie eine weitere Zentrifugation der DNA-Extraktion für 1 min bei RT mit 13 000 Upm in ein neues Reaktionsgefäß. Abschließend wurde der Vektor anhand eines Längenstandards im Agarosegel kontrolliert.

### **3.2.4 Ligation der viralen DNA mit dem Vektor**

Für die Ligation der präparierten DNA-Fragmente mit überhängenden einzelsträngigen Enden («sticky ends») wurde der DNA Ligation Kit (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Der 20 µl-Ligationsansatz enthielt 13 µl DNA-Fragment (aus der QIAEX-Extraktion), 2 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer, 1 µl Polyethylenglykol (50 %), 1 µl 10 mM rATP, 1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl) sowie 2 µl Vektorpräparation (ca. 200 ng pBluescript II KS+) und wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert.

### **3.2.5 PCR zur Amplifikation des Pentonbasis-Gens**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein in vitro-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Hierbei wird die Fähigkeit von DNA-Polymerasen ausgenutzt, einen DNA-Einzelstrang zum Doppelstrang aufpolymerisieren bzw. ergänzen zu können,

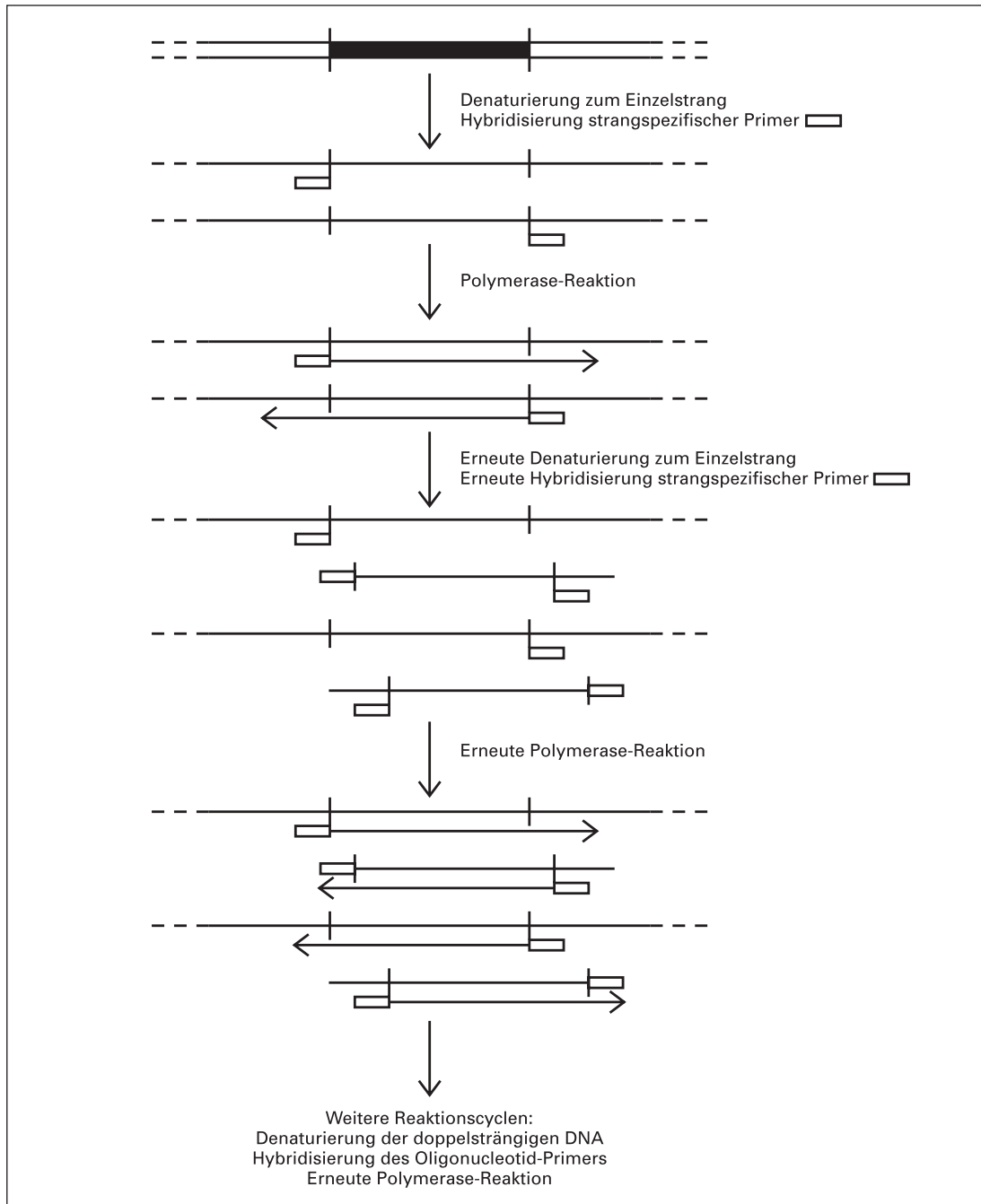
sofern ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Die verwendeten Primer in der PCR stammen aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenzen und sind strangspezifisch. Die PCR wird in automatisierten Verfahren durchgeführt und setzt sich zusammen aus sich wiederholenden Zyklen folgender Reaktionsschritte:

**Hitzedenaturierung:** Die zu amplifizierende DNA liegt zunächst als Doppelstrang vor. Durch Erhitzen auf ca. 90°C wird die DNA in einzelsträngige Matrizen («Templates») zerlegt. Ein anschließendes schnelles Abkühlen der Reaktionsansätze verhindert die Reassoziaton der DNA-Einzelstränge.

**Primerhybridisierung (Annealing):** Die spezifischen, gegenläufig orientierten, im Überschuß vorhandenen Primer lagern sich an die komplementären Strangabschnitte des einzelsträngigen Templates an, wenn der PCR-Ansatz die Schmelztemperatur der Primer erreicht hat oder darunter liegt.

**Primerverlängerung (Extension):** Durch die Anlagerung der Oligonukleotide entsteht ein kurzer doppelsträngiger Bereich, der von der DNA-Polymerase als Startpunkt erkannt wird. Die zugegebene DNA-Polymerase synthetisiert dann in Anwesenheit von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) komplementäre DNA-Stränge, welche wiederum nach Hitzedenaturierung als Templates dienen und in einer erneuten Reaktion komplementiert werden.

Als hitzestabile DNA-Polymerase wird die in *E. coli* klonierte Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* verwendet. Da dieses Enzym ein Temperaturoptimum von 72°C aufweist und für kurze Zeit bei Temperaturen von über 90°C stabil ist, können alle Reaktionsschritte im gleichen Reaktionsansatz durchgeführt werden, ohne daß nach jedem Denaturierungsschritt neues Enzym addiert werden muß. Die Reaktionsfolgen werden zyklisch wiederholt und somit der entsprechende DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt.



**Abb. 5:** Die PCR. Zuerst wird die doppelsträngige DNA in Einzelstränge zerlegt. Die dann entstehenden Hybridmoleküle aus jeweils einem Strang der zu amplifizierenden DNA und dem zu diesem Strang komplementären Primer dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerase, die in Gegenwart der vier Nucleotide komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Die entstandenen DNA-Doppelstränge werden dann erneut als Templates für die Synthese genutzt (Ibelgaufs, 1990).

Das folgende Primerpaar wurde für die Amplifikation des Ad 8-Penton-Gens verwendet:

Pent 8 B (vorwärts): 5'-AGGCGCGCGGTGGTGTCTCTCTCC-3' und

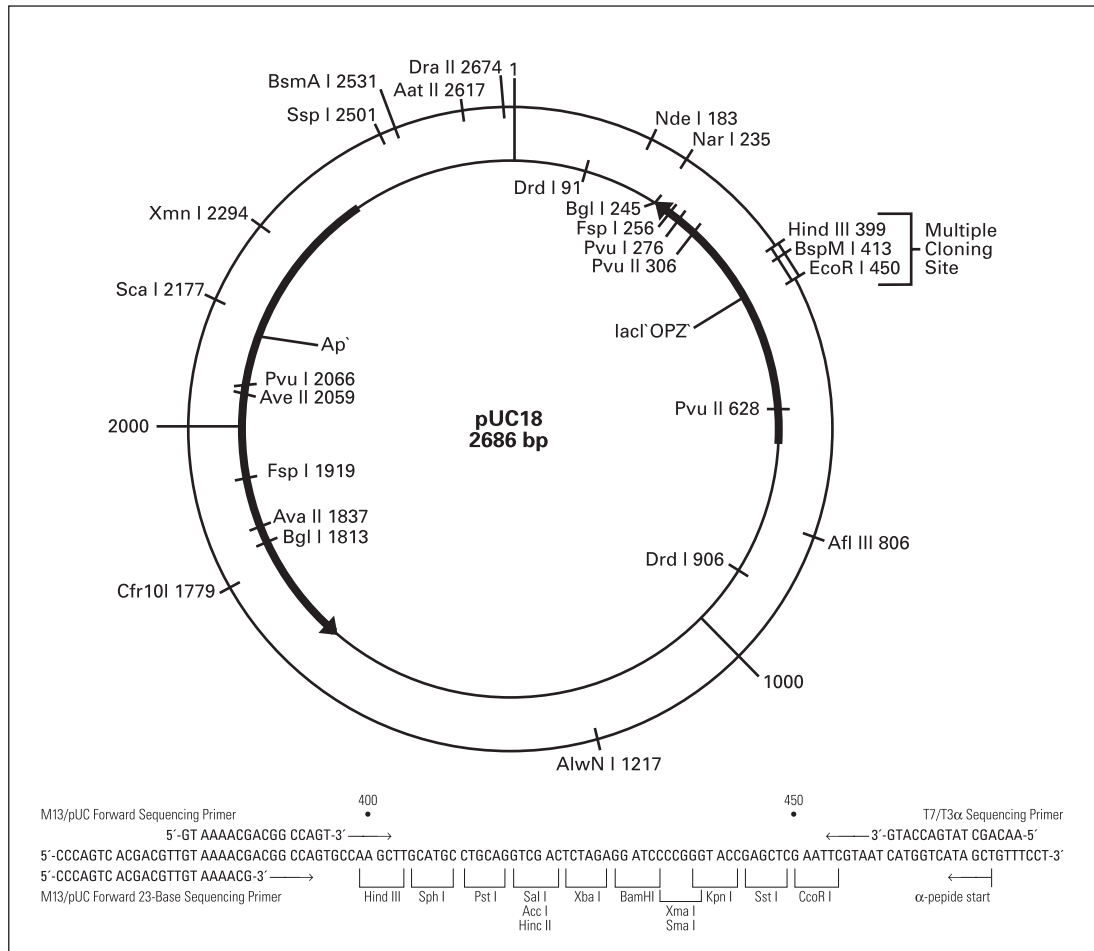
Pent 8 E (rückwärts): 5'-AAAGGTGCGACTAGAGAGCACGCGCG-3'.

Für die PCR wurden 10 µl DNA eingesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten außerdem 10 µl 10x Taq-Puffer (Boehringer, Mannheim), 10 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 2 mM, Perkin Elmer) und 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl, Boehringer, Mannheim). Die beiden Primer der 3'- und 5'-flankierenden Bereiche des zu amplifizierenden Pentonbasis-Gens wurden in einer Endkonzentration von jeweils 0,5 µM (= 1 µl) zugesetzt. Die Ansätze wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und abschließend zum Schutz vor Verdunstung mit 80 µl Mineralöl überschichtet. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler »VARIUS« (Landgraf Laborgeräte, Langenhagen) durchgeführt. Die Synthese begann mit einer Hitzedenaturierung der zu vermehrenden doppelsträngigen DNA für 300 sec bei 93 °C. Die weiteren Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt: Primerhybridisierung (»Annealing«): 30 sec bei 45 °C, Primerverlängerung (»Extension«): 60 sec bei 72 °C, Hitzedenaturierung: 300 sec bei 92 °C. Nach 35 PCR-Zyklen erfolgte eine abschließende Primer-Extension für 400 sec bei 72 °C, um sicherzustellen, daß die Enden des amplifizierten PCR-Produktes aufgefüllt wurden. Nachdem die PCR-Produkte mittels Restriktionsanalyse überprüft worden waren, konnten sie bei –20 °C aufbewahrt oder kloniert werden.

### **3.3 Sequenzierung des Pentonbasis-Gens**

#### **3.3.1 Einklonierung der amplifizierten Penton-DNA in den Vektor pUC18**

Die »blunt-end«-Ligation, die Verknüpfung von DNA-Molekülen mit glatten Enden, ermöglichte es, das PCR-Produkt mit der Vektor-DNA zu ligieren. Der verwendete »Sure Clone Ligation Kit« (Pharmacia, Freiburg) erlaubt eine schnelle und zuverlässige Klonierung von PCR-Produkten. Der im Kit enthaltene Klonierungsvektor pUC 18 ist in der Abbildung 6 dargestellt.



**Abb. 6:** Der Vektor pUC 18 mit seiner »Multiple Cloning Site« (Katalog Gibco BRL).

Im ersten Reaktionsschritt (eine kombinierte »Polish und Kinase«-Reaktion) wurden 16 µl des PCR-Amplifikates, 1 µl Klenow-Fragment, 2 µl 10x Blunting/Kinase-Puffer sowie 1 µl T 4-Polynukleotid-Kinase für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Klenow-Polymerase wurden einzelsträngige 3'-überhängende Enden entfernt. Es entstanden »blunt ends«, die anschließend durch die T4-Polynukleotid-Kinase phosphoryliert wurden. Zur Inaktivierung der Enzyme sowie zur Entfernung von Proteinen und Nukleasen wurden die DNA-Präparationen mit Phenol/ Chloroform extrahiert. Der DNA-haltige Überstand wurde anschließend durch Zentrifugation (30sec, 13 000 Upm, RT) über mit Sephacryl S-200 präparierte »MicroSpin Columns« aufgereinigt. Der 20 µl-Ligationsansatz enthielt 7 µl Produkt der »Polish und Kinase«-Reaktion, 1 µl dephosphorylierten pUC 18/cut Sma I-Vektor (50 ng), 10 µl 10x Ligase Puffer, 1 µl 200 mM DTT-Lösung sowie 1 µl T 4-DNA-Ligase



(8,5 U/ $\mu$ l) und wurde 60 min bei 16 °C inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde bei –20 °C bis zur Transformation aufbewahrt.

### **3.3.2 Transformation des rekombinanten Plasmids**

Als Wirt für die rekombinanten Plasmide wurden Zellen des Bakterienstammes »E. coli XL 1-blue Supercompetent Cells« eingesetzt. Für die Transformation wurden 100  $\mu$ l der bei –80 °C gelagerten XL 1-blue-Zellen behutsam aufgetaut, zum Aufschluß mit 1,7  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l Ligationsprodukt folgten weitere 30 min auf Eis. Nach einem Hitzeschock von 42 °C im Wasserbad für 45 sec und einer erneuten Inkubation auf Eis für 2 min wurden 880  $\mu$ l SOC-Medium (20  $\mu$ l 20 % Glukose und 10  $\mu$ l 10 % Magnesiumsulfat enthaltend) addiert. Daran schloss sich eine Inkubation bei 37 °C über 60 min an. Die Suspension wurde dann auf Ampicillin (50  $\mu$ g/ml)- und Tetracyclin (12,5  $\mu$ g/ml)-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

### **3.3.3 Plasmidpräparation**

Zur Extraktion der Plasmid-DNA wurde der QIAprep Spin Plasmid Kit des Herstellers Qiagen verwendet.

Pro Bakterienkolonie wurde eine 5 ml-Kultur in LB-Medium (versetzt mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin und 12,5  $\mu$ g/ml Tetracyclin) angesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurden die nach der Transformation das Ad8-Pentonbasis-Gen enthaltenden E. coli-Derivate durch Zentrifugation bei 13 000 Upm über 2 min pelletiert. Zur Destabilisierung der Bakterienzellmembranen erfolgte dann zunächst die Resuspension der Zellen in 250  $\mu$ l gekühltem, 100  $\mu$ g/ $\mu$ l RNAse A enthaltendem Puffer P1. Die anschließende Zugabe von 250  $\mu$ l NaOH- und SDS-haltigem Puffer P 2 sorgte dann für die vollständige Lyse der Bakterienzellen. Nach Addition von 350  $\mu$ l neutralisierendem Puffer N3 folgte eine erneute Zentrifugation mit 13 000 Upm für 10 min zur Sedimentierung der Bakterienbestandteile. Der gewonnene, plasmidhaltige Überstand wurde auf »QIAprep spin«-Säulen gegeben und unter Zentrifugation

zweimal mit PE-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte die Eluation der Plasmid-DNA (maximale Ausbeute ca. 20 µg) in 100 µl ddH<sub>2</sub>O. Bis zur Sequenzierung wurden die Plasmid-DNA-Präparationen bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.3.4 Kontrolle der Plasmid-DNA mittels Restriktionsanalyse**

Zur Überprüfung der rekombinanten Plasmide wurden in einem 10 µl-Restriktionsansatz jeweils 2 µl der Plasmid-DNA-Präparation mit 1 µl 10x Inkubationspuffer und 10U anhand von Restriktionskarten ausgewählter, adäquater Restriktionsenzyme für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte der Versatz mit 5 µl Stop-Puffer zur Inaktivierung des Enzyms. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden in 1% TBE-Agarosegel bei 100V aufgetrennt. Durch den Gehalt von 5 µl Ethidiumbromid-Lösung pro 100ml Agarosegel konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe des mitgelaufenen DNA-Längensstandards »DNA Molecular Weight Marker VI« (Boehringer, Mannheim) konnten anhand der charakteristischen Bandenverteilung die erfolgreich rekombinierten Plasmide identifiziert werden.

### **3.3.5 Sequenzierung der Pentonbasis-DNA**

Die Sequenzierung des die Ad 8-Pentonbasis kodierenden Gens erfolgte nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Verwendet wurde der T 7-Sequencing Kit von Pharmacia Biotech. Die Didesoxy-Methode basiert auf der enzymatischen Kopierung des zu sequenzierenden DNA-Stranges durch eine DNA-Polymerase. Die DNA muß in einzelsträngiger Form vorliegen, damit sich die erforderlichen Primer an diese anlagern können. In Anwesenheit der vier Nukleosidtriphosphate katalysiert die DNA-Polymerase anschließend die Verlängerung der Primer in komplementärer Sequenz zur Matrizen-DNA. Durch den Einbau von 5'-αS<sup>35</sup>-dATP werden die entstehenden DNA-Fragmente radioaktiv markiert. Während der Synthesereaktion kommt es durch den Einbau von 2',3'-Didesoxynukleotiden (ddNTP) zum Abbruch der Kettenpolymerisation, da diese nicht die notwendige 3'-OH-Gruppe für die

5',3'-Phosphodiester-Bindungen liefern. Führt man die Abbruchreaktion für die vier DNA-Basen mit ihren entsprechenden ddNTP getrennt durch, entstehen in jedem Ansatz unterschiedlich große Fragmente. Durch parallele elektrophoretische Auftrennung der Fragmentgemische in einem Polyacrylamidgel und anschließende Autoradiographie kann die Sequenz der DNA anhand der Bandenfolge ermittelt werden.

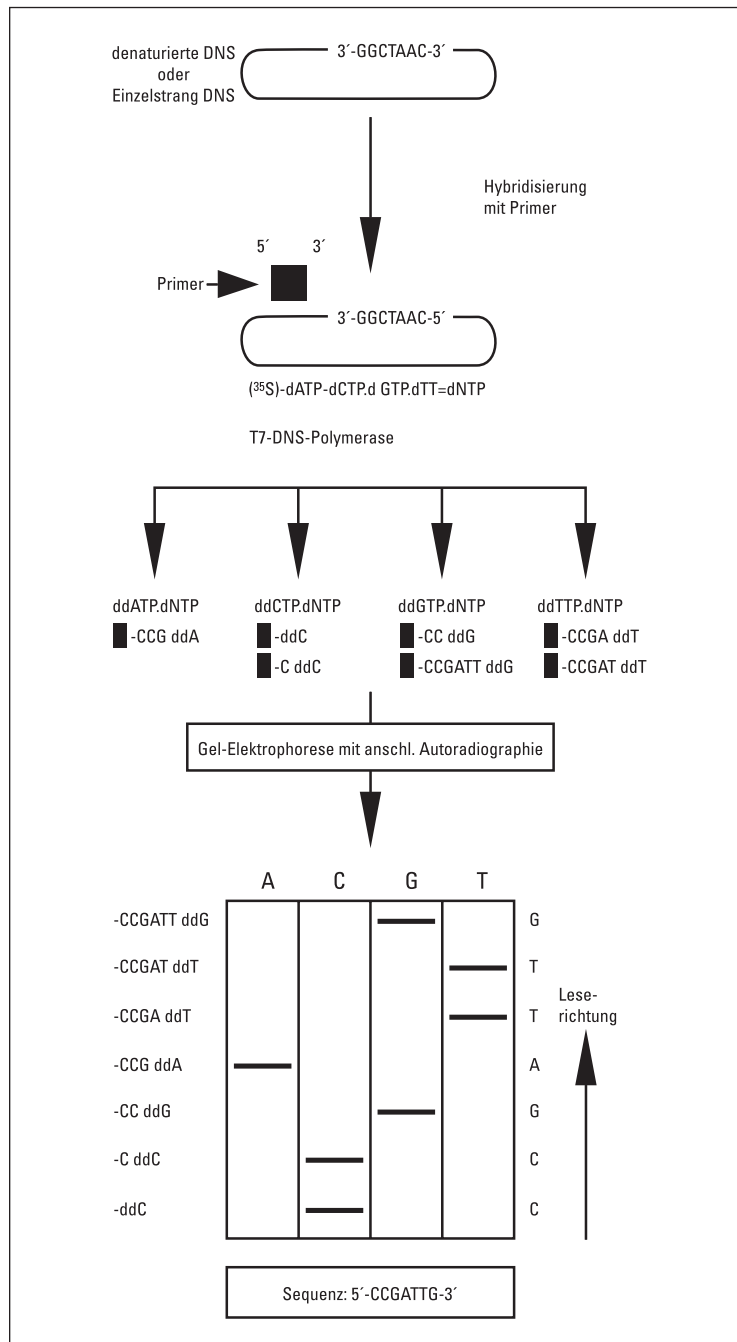


Abb. 7: Schematische Darstellung der Dideoxy-Sequenzierung (Sanger et al., 1977).

**Alkalische Denaturierung:** Für die Denaturierung wurden etwa 2 µg Plasmid-DNA, gelöst in 32 µl ddH<sub>2</sub>O, mit 8 µl 2 M NaOH versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Neutralisation durch Zugabe von 7 µl 2 M Ammoniumacetat und 4 µl ddH<sub>2</sub>O wurde die DNA mit 120 µl Ethanol 20 min auf Trockeneis gefällt und anschließend 15 min bei 13 000 Upm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

**Hybridisierung («Annealing»):** Zu den 10 µl Denaturierungsansatz wurden je 2 µl 5 µM Sequenzierungsprimer und 2 µl Annealing-Puffer (1 M Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 160 mM DTT) addiert. Die Ansätze wurden 5 min bei 65 °C und 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Während der Hybridisierungsreaktion lagerte sich der Primer an das zu sequenzierende DNA-Template an, somit entstand ein kurzer Doppelstrang, der im Weiteren als einheitlicher Polymerisationsstartpunkt der eigentlichen Sequenzierungsreaktion diente.

**Synthese («Labelling»):** Zu den Hybridisierungsansätzen wurden je 3 µl »Labelling-Mix« (jeweils 1,375 µM dCTP, dGTP und dTTP in 333,5 mM NaCl), 2 µl 1:5 in »Enzym Dilution-Puffer« (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM DTT, 100 µg BSA/ml, 5 % Glycerol) verdünnte T 7-Polymerase sowie 1 µl radioaktiv markiertes dATP (5'-αS<sup>35</sup>-dATP, 40 MBq/100 µl, Hartmann Analytic) hinzugefügt. Anschließend folgte eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur.

Während der Labelling-Reaktion wurden alle vier Nukleotide (dATP radioaktiv markiert) in den zum Template komplementären Strang eingebaut. Durch die Verwendung des oben beschriebenen dATP wurde der neu synthetisierte Strang radioaktiv markiert.

**Termination:** In einer Mikrotiterplatte wurden je 2,5 µl der vier Terminations-Mixe (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) in vier untereinander liegende Wells vorgelegt. Das Produkt der Synthesereaktionen wurde dann auf die vier untereinander liegenden Terminations-Wells verteilt, je 4,5 µl in ein ATP-, CTP-, GTP- und TTP-Well. Nachfolgend schloß sich eine Inkubation bei 37°C über 5 min an. Danach wurden die Terminations-Wells mit jeweils 4 µl Stop-Puffer (Bromphenol und Xylencyanol enthaltend) versetzt und somit die Reaktion beendet.

In der Terminationsreaktion wurden neben den dNTP auch die ddNTP in den wachsenden, neu synthetisierten Strang eingebaut. Da die Stränge, in die ein Didesoxynukleotid eingebaut wurde, nicht weiter verlängert werden konnten, endete die Polymerisationsreaktion an dieser Stelle. Somit entstanden unterschiedlich lange DNA-Fragmente.

### **3.3.6 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Die Analyse der Sequenzierungsprodukte erfolgte auf 0,4 mm dicken, 6 %-igen Polyacrylamidgelen (Gel-Mix 6, Gibco BRL). Der Gel-Mix beinhaltet eine vorbereitete Gel-Lösung, die alle erforderlichen Bestandteile (5,7 % Acrylamid, 0,3 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 7M Harnstoff, 3 mM TEMED) für ein 6 %-iges Polyacrylamidgel enthält. Nach Zugabe von 450 µl 10 %-igem Ammoniumpersulfat wurde die Gel-Lösung zwischen zwei in 0,4 mm Abstand zueinander befindliche Glasplatten gegossen. Eine der Glasplatten war zuvor mit Gleitsilan (Sigmacote, Sigma) beschichtet worden. Das Gel polymerisierte innerhalb von 45 min und wurde anschließend in eine Elektrophoresekammer (Modell 52, Gibco BRL) eingespannt. Nach Füllung der Pufferkammern mit TBE-Puffer erfolgte ein etwa 30 minütiger Vorlauf bei 100 Watt zur Erwärmung des Gels. Anschließend wurden jeweils 4 µl der zuvor hitzedenaturierten (85°C über 5 min) Terminationsprodukte jedes Sequenzierungsansatzes in der Reihenfolge »A«, »C«, »G« und »T« aufgetragen und einem Lauf von ca. 1,5 h bei 100 Watt unterzogen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf »Whatmann Papier 3« gelegt und bei 80°C über 1 h in einem

Vakuumtrockner (Gibco BRL) getrocknet. Die autoradiographische Darstellung der Sequenzen erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht auf einem Kodak Diagnostic Film X-OMAT AR 35 x 43.

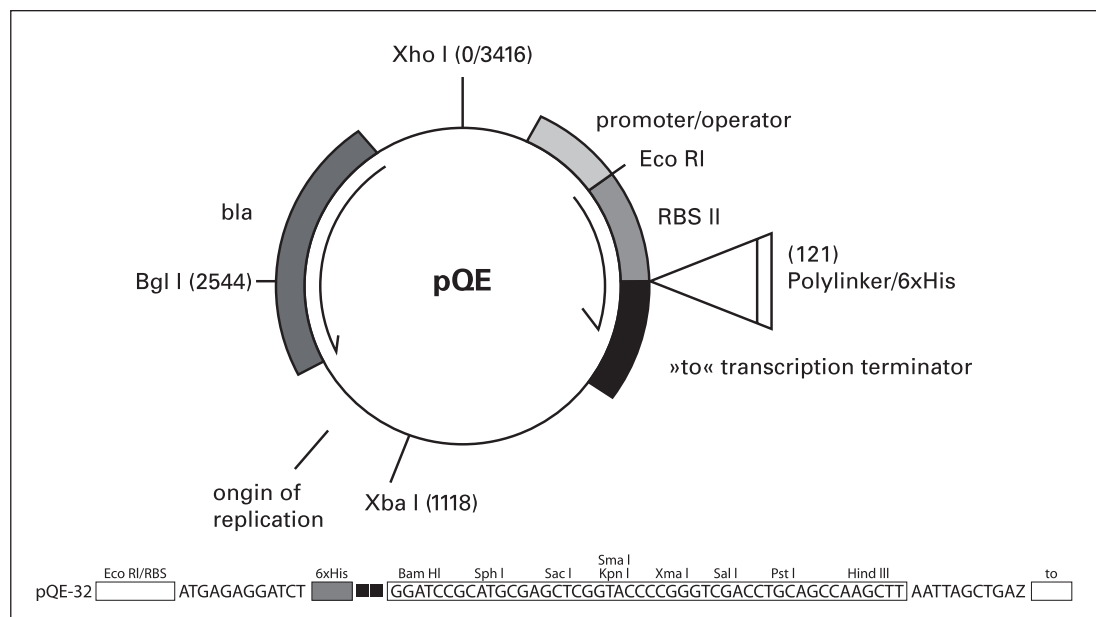
Die so ermittelte Sequenz des Ad8-Pentonbasis-Gens wurde unter der Nr. AJ 249343 in die EMBL-Datenbank eingelesen.

### 3.4 Mutation des Pentonbasis-Gens

#### 3.4.1 Einklonierung des Pentonbasis-Gens in den Expressionsvektor

Die Präparation des Expressionsvektors pQE 32 erfolgte in einem 20 µl-Restriktionsansatz mit je 5 U (0,5 µl) der Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI, 2 µl 10x Inkubationspuffer sowie 17 µl des Plasmids pQE 32. Der Ansatz wurde über 90 min bei 37 °C inkubiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben. Das einzuklonierende Plasmidminipräparationsprodukt der Ad8-Pentonbasis wurde in einem 10 µl-Ansatz (8 µl DNA, je 0,5 µl BamHI und SalI, 1 µl One-Phor-All-Puffer) ebenfalls einem Restriktionsverdau (45 min, 37 °C) unterzogen. Anschließend erfolgte die Ligation der Ad8-Pentonbasis in den Vektor unter Einsatz des DNA-Ligation-Kit (siehe 3.2.4).

Für alle Mutationen diente das pQE-Plasmid mit dem enthaltenen Ad8-Pentonbasis-Gen als Vorlage.



**Abb. 8:** Der Expressionsvektor pQE mit seiner MCS (Katalog Qiagen, Düsseldorf).

### 3.4.2 Austausch einzelner Aminosäuren

Die vergleichende Sequenzanalyse der Pentonbasis verschiedener Ad-Serotypen (siehe 4.2, Abbildung 11) zeigte eine hypervariable Region in der Mitte des Pentonbasis-Gens, die bei vielen Serotypen ein zentrales RGD-Tripeptid aufweist, flankiert von Bereichen hoher Homologie.

Auf Grundlage der vorliegenden Pentonbasis-Sequenzen wurden 20 Punktmutationen ausgewählt, die sich über den gesamten Bereich des Ad 8-Pentonbasis-Gens verteilten, 12 befanden sich im konservierten Abschnitt vor der hypervariablen Region, eine Mutation betraf die hypervariable Region, sieben lagen in dem konservierten Bereich dahinter. Außerdem wurden Mutationen festgelegt, die anstelle der RGD-Sequenz die als alternative Integrin-Erkennungssequenzen bekannten AS-Abfolgen DGEA und EILDV (siehe oben) aufweisen. Eine weitere Mutation variierte das RGD-Motiv zu der mutmaßlich nicht Integrin-bindenden Sequenz RAE.

Pro Mutation wurden entweder zwei, drei oder vier Aminosäuren ausgetauscht. Die Mutationen wurden so gewählt, daß die einzelnen Aminosäuren gegen solche mit divergenten biochemischen Eigenschaften ausgetauscht wurden, so z. B. hydrophile gegen hydrophobe, saure gegen basische etc..

Die mutierten Pentonbasis-Proteine wurden entsprechend der eingefügten Mutation benannt, beispielsweise wurde die Original-Ad 8-Aminosäure-Sequenz »PPP« verändert zu »NNN«, die resultierende Bezeichnung des Proteins war 8P-NNN.

Die nachfolgende Übersicht zeigt Lokalisation, ursprüngliche Sequenz und Mutation der punktmultierten rekombinanten Pentonbasis-Proteine. Eine graphische Darstellung der Positionen im Gen findet sich außerdem in Abbildung 11.

AS-Position	ursprüngliche Sequenz der Ad8-Pentonbasis	Mutation
17–19	PPP	NNN
104–106	HSN	WAC
134–137	RWGG	QYSS
138–141	DLKT	ANAP
197–199	EGN	ASG
206–208	IDL	TIQ
221–223	GRQ	DFI
231–234	IGVK	NEDA
260–268	FHPDVLL	S(HPD)NNQQ
269–270	PG	QD
284–286	LGI	QES
311–312	LL	ST

Tab. 4: Punktmutationen vor der hypervariablen Region.

AS-Position	ursprüngliche Sequenz der Ad8-Pentonbasis	Mutation
365–367	RGD	RAE
365–367	RGD	DGEA
365–367	RGD	EILDV
415–417	SYN	GYI

Tab. 5: Punktmutationen im Bereich der hypervariablen Region.

AS-Position	ursprüngliche Sequenz der Ad8-Pentonbasis	Mutation
431–432	YR	FG
451–452	TL	MT
456–458	PDV	QNE
475–478	DPVT	ATEA
489–490	PV	QS
526–527	RF	CT
548–550	VPA	EDH

Tab. 6: Punktmutationen nach der hypervariablen Region.



Die Sequenzen der Vorwärts-Primer, welche für die Primer-vermittelte Mutagenese verwendet wurden, sind nachfolgend aufgelistet (die mutierten Nukleotide sind unterstrichen, die komplementären Rückwärts-Primer nicht aufgeführt):

8 P-NNN: 5'-GCGGTGGTGTCTCTAACAACAACTCGTACGAAAGCGTG-3'

8 P-WAC: 5'-CTCAACTACCAAAACGACTIGGGCGTGCTTCTAACCACGGTGGTG-3'

8 P-QYSS: 5'-GACGAGCGGTCCCAGTACAGCAGCGATCTGAAGACC-3'

8 P-ANAP: 5'-CGGTGGGGCGGTGCAAACGCTCCCATTTGCACACC-3'

8 P-ASG: 5'-GAGTTTACCCTGCCCCGTTCTGTTTTTCCGAGACCATG-3'

8 P-TIQ: 5'-GAGACCATGACCACTATCCAGATGAACAACGCC-3'

8 P-DFI: 5'-GAAAACACTTGCAGTGGACTTCATAAAATGGCGTGCTGGAGAGC-3'

8 P-NEDA: 5'-CTGGAGAGCGATAATGAAGATGCGTTTGACAGCAGAAATTC-3'

8 P-S(HPD)NNQQ: 5'-GCCTCCCATCCCGACAACAACCAGCAGCCGGGCTGCGGGGTG-3'

8 P-QD: 5'-CCCGACGTGGTGCTGCTGCAGGACTGCGGGGTGGACTTCACC-3'

8 P-QES: 5'-CGCCTGAGCAACCTTCAAGAGAGTCGCAAGAAG-3'

8 P-ST: 5'-GGCAACATCCCCGCTCGACGGATGTGGAAGCATACC-3'

8 P-RAE: 5'-GGTGGTGAAATTAGGGCTGAGACTTTTTCTTACCACC-3'

8 P-GYI: 5'-GATGCTAGCAAGAGAGGCTATATGTCATAGGGGACACC-3'

8 P-FG: 5'-GACACCCATGACACCCTGTICGCAGCTGGTACCTGTCC-3'

8 P-MT: 5'-GGGGTACAGTCGTGGAIGACGCTCACCACCCCGGAC-3'

8 P-QNE: 5'-CTGCTCACCACCCGAAACGAGACTGCGGCGCG-3'

8 P-ATEA: 5'-CCGGACCTCATGCAAGCCACCGAAGCCTTCCGCTCCACCCAG-3'

8 P-OS: 5'-CAAGTCAGCAACTACCAGTCGGTTGGCACCGAGCTC-3'

8 P-CT: 5'-CCCCACGTCTTCAACIGCACCCCCGACAACCAGATCC-3'

8 P-EDH: 5'-GTTAGTGAAAACGAAGACCATCTCACAGATCACGGG-3'

8 P-DGEA: 5'-GCAAATGGAGGTGGTGAAATGATGGAGAAGCAACTTTTCTTACCACCGAACAG-3'

8 P-EILDV: 5'-GCAAATGGAGGTGGTGAAATGAAATCTTCGATGTCACTTTTCTTACCACCGAACAG-3'

Für den Austausch der Aminosäuren durch Primer-vermittelte Mutagenese wurde der »QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit« des Herstellers Stratagene verwendet.

Der Kit erlaubt die wenig zeitaufwendige Herstellung von Punktmutationen in doppelsträngiger DNA mit hoher Präzision in praktisch jedem beliebigen Plasmidvektor.

Neben der in einem Vektor befindlichen doppelsträngigen, zu mutierenden DNA werden zwei synthetische, die gewünschte Mutation enthaltende Primer benötigt. Diese beiden Oligonukleotide, jedes, von der zentral gelegenen Mutation abgesehen, komplementär zu den gegenläufigen DNA-Strängen des zu verändernden Genomabschnittes, werden, ähnlich wie bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), temperaturabhängig durch eine mit hoher Präzision arbeitende Pfu-DNA-Polymerase verlängert. Nach Angaben des Herstellers weist diese im Kit enthaltene Polymerase eine gegenüber konventionellen thermostabilen Polymerasen, z.B. der bei der PCR verwandten Taq-Polymerase, um den Faktor 12 verringerte Fehlerrate bei der Replikation auf. Nach der Amplifikation wird mittels Zugabe einer für methylierte Bakterien-DNA spezifischen Dpn I-Endonuklease die ursprüngliche, nicht die gewünschte Mutation enthaltende, DNA verdaut.

**Amplifikation:** Die Reaktionsansätze enthielten 5  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer, 25  $\mu$ l der Ad8-Pentonbasis (entsprechend etwa 50 ng DNA), je nach Konzentration zwischen 1 und 4  $\mu$ l (entsprechend 125 ng) der beiden komplementären Primer, 1  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mix sowie 1  $\mu$ l Pfu-DNA-Polymerase. Die Ansätze wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50  $\mu$ l aufgefüllt und zum Schutz vor Verdunstung mit 30  $\mu$ l Mineralöl überschichtet. Die Mutagenese wurde, wie bereits die PCR, in einem Thermocycler »VARIUS« des Herstellers Landgraf durchgeführt. Der Amplifikationszyklus begann mit einer Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 30 sec. Darauf folgte die Phase der Primerhybridisierung über 60 sec bei 55 °C. Die abschließende Primer-Extension dauerte pro Zyklus 10 min bei 68 °C. Dieser Zyklus wurde 18x durchlaufen. Danach schloß sich eine Inkubation der Reaktionsansätze auf Eis für 2 min an.

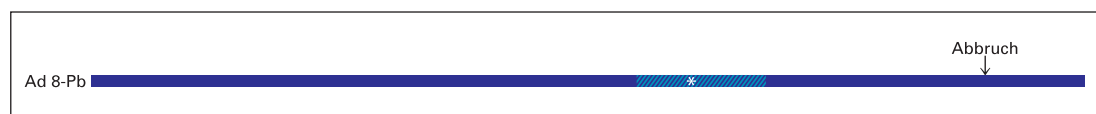
**Digestion:** In jeden Ansatz wurde 1  $\mu$ l Dpn I-Restriktionsenzym unter die Mineralölschicht appliziert. Die Ansätze wurden mit der Pipette gemischt und anschließend zentrifugiert (60 sec, 13 000 Upm, RT). Es folgte eine Inkubation über 60 min bei 37 °C, um die parenterale, nicht-mutierte DNA zu verdauen.

**Transformation:** Pro Reaktionsansatz wurden 50  $\mu$ l Epicurian Coli XL1-blue Supercompetent Cells auf Eis langsam aufgetaut. Jeweils 1  $\mu$ l des Digestionsprodukts wurden addiert, die Ansätze wurden vorsichtig durchmischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock im Wasserbad (42 °C, 45 sec), anschließend wurden die Ansätze erneut für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium wurden die Ansätze über 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Methicillin- und Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht bebrütet.

Die das mutierte Pentonbasis-Gen enthaltenen Plasmide wurden unter Einsatz des QIAprep Spin Plasmid Kit extrahiert (siehe 3.3.3), die Punktmutationen per DNA-Sequenzierung (siehe 3.3.5 und 3.3.6) kontrolliert.

### 3.4.3 Konstruktion eines verkürzten Pentonbasis-Proteins

Ein verkürztes («truncated») Pentonbasis-Protein wurde erzeugt durch Einfügen eines TGA-Stop-Codons in die Sequenz des Pentonbasis-Gens, welches bei der späteren Expression des Gens einen Abbruch der Transkription bewirkte. Das Stop-Codon wurde mit Hilfe des QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (siehe 3.4.2) an Aminosäureposition 470 des Ad 8-Pentonbasis-Gens eingefügt, die Abbruchstelle ist nachfolgend schematisch dargestellt, die genaue Position findet sich in Abbildung 11. Die hypervariable Region ist schraffiert, das RGD-Tripeptid durch ein \* markiert.



**Abb. 9:** Die durch Stop-Codon verkürzte Pentonbasis-Mutation.

Die Sequenz des Vorwärts-Primers (8 P-Tr) ist nachfolgend angegeben, die mutierten Nukleotide sind unterstrichen, die Sequenz des komplementären Rückwärts-Primers ist nicht aufgeführt.

8 P-Tr: 5'-GTTAGTGAAAACGTGTGAGCTCTCACAGATCAC-3'

Auch hier wurde die korrekte Insertion des Stop-Codons durch Sequenzierung des mutierten Gens kontrolliert.

### **3.4.4 Herstellung mit Deletionen versehener Pentonbasis-Proteine**

Es wurden vier Variationen des Pentonbasis-Gens konstruiert, in denen die komplette hypervariable Region (einschließlich der RGD-Sequenz) und/oder Passagen vor oder nach der hypervariablen Region unter Einsatz von Restriktionsenzymen herausgeschnitten und entfernt wurden. Da das Pentonbasis-Gen jeweils nur eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme Stu I, Nhe I und Sac I aufweist, wurde durch Primer-vermittelte Mutagenese (siehe 3.4.2) eine zweite Schnittstelle für jedes Enzym eingefügt. Die folgenden Primer wurden verwendet (die mutierten Nukleotide sind unterstrichen, die Sequenzen der komplementären Rückwärts-Primer sind nicht aufgeführt):

8 P-Nhe I: 5'-CTCAAAGCAAGAATGCTAGCGAGGAAGCCACCCAG-3'

8 P-Stu I: 5'-GCCCTGCTGGATGAGGCCTCATACCTCAAAGC-3'

8 P-Sac I: 5'-GCCGCTGACAAGGAGCTCGTTATTAAGCCC-3'

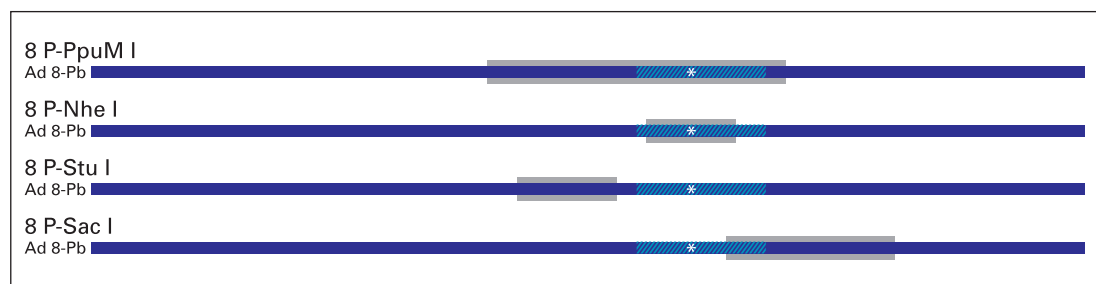
Für das Restriktionsenzym PpuM I, welches ebenfalls verwendet wurde, weist das Pentonbasis-Gen von Ad 8 zwei Schnittstellen auf.

Nach enzymatischer Digestion und elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegel (siehe 3.2.1) wurden die entsprechenden DNA-Fragmente unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt (siehe 3.2.2). Die Religation erfolgte mit dem DNA Ligation Kit von Stratagene (siehe 3.2.4). Der Ligationsansatz enthielt jeweils 2 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer, 1 µl 10 mM rATP, 1 µl T4 DNA Ligase, 15 µl DNA sowie 1 µl H<sub>2</sub>O und wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Mutanten wurden zur Kontrolle sequenziert.

Die resultierenden Proteine wurden, der verwendeten Restriktionsendonuklease entsprechend, benannt mit:

- 8 P-PpuM I (deletierte Region AS 212–362),
- 8 P-Nhe I (deletierte Region AS 290–335),
- 8 P-Stu I (deletierte Region AS 228–282) und
- 8 P-Sac I (deletierte Region AS 328–416).

Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf die Sequenz des Original-Pentonbasis-Gens. Die folgende Grafik zeigt schematisiert die Ad 8-Pentonbasis, die hypervariable Region ist schraffiert, die ungefähre Position des RGD-Triplets durch ein \* markiert. Das durch Restriktion entfernte Fragment ist grau unterlegt. Die exakten Restriktionsstellen sind in der Abbildung 11 dargestellt.



**Abb. 10:** Die Restriktionsfragmente in Bezug zur hypervariablen Region der Pentonbasis.

### 3.4.5 Transformation der mutierten Pentonbasis-DNA

Für die Expression wurden das Ad 8-Pentonbasis-Gen und die insgesamt 28 konstruierten Mutationen, die sich in dem zur Expression befähigten Plasmid pQE 32 befanden, in das *E. coli*-Derivat M15 (Qiagen) transformiert. Pro Ansatz wurden 50  $\mu$ l der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrten M15-Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l der Pentonbasis-DNA und anschließender Inkubation auf Eis für 30 min folgte ein Hitzeschock von  $42^{\circ}\text{C}$  über 45 sec im Wasserbad. Nach weiteren 2 min auf Eis wurde jeder Ansatz mit SOC-Medium auf ein Volumen von 500  $\mu$ l aufgefüllt. Es schloß sich eine Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  über 60 min an, danach wurden die Ansätze auf mit Kanamycin und Ampicillin (jeweils 50  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzten LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Die entstandenen Kolonien wurden dann in jeweils

5 ml YT-Medium (50 µg/ml Kanamycin und Ampicillin enthaltend) überführt und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.5 Expression der Pentonbasis-Proteine**

Für die Expression der rekombinanten Pentonbasis-Proteine in den M15-Zellen wurden jeweils 500 ml 2x YT-Medium (mit je 1 µl/ml Kanamycin und Ampicillin) mit 15 ml der M15-Übernachtskultur (siehe 3.4.5) beimpft und in einem Rundschtüttler (190 Upm) bei 37 °C über 2 h 30 min inokuliert. Das Wachstum bzw. die Vermehrung der Bakterien wurde durch Messung der OD<sub>600</sub> kontrolliert. Bei Erreichen einer OD von 0,7–0,9 wurde durch Addition von 10 ml 0,05 mM IPTG der Expressionsvorgang induziert.

Nach 4 h Expression bei 37 °C im Rundschtüttler wurden die Bakterienkulturen bei 4 °C und 3000 Upm über 15 min zentrifugiert. Nach kurzem Einfrieren bei –20 °C und anschließendem Auftauen wurden die Pellets in 4 ml 0,25 % Tween-20/0,1 mM EGTA-Puffer resuspendiert und nachfolgend beschallt (6x 30 sec, dazwischen jeweils 1 min Kühlung auf Eis; Sonicator Ultrasonic processor XL, Heatsystems, Farmingdale). Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für eine Stunde. Das Lysat wurde bei 13 000 Upm über 10 min bei RT zentrifugiert, um den Zelldetritus zu pelletieren. Der das Pentonbasis-Protein enthaltene Überstand wurde geerntet.

Ein Versuch, durch Dialyse in absteigenden Harnstoffkonzentrationen die Löslichkeit der exprimierten Proteine zu erhöhen, blieb ohne wesentlichen Erfolg. Zur Ankonzentration der Proteine wurden »Centriprep 30«-Konzentratoren (Amicon) verwendet, der Tween/EGTA-Puffer wurde durch mit Phosphat gepufferte Saline (PBS) ausgetauscht und die Proteinkonzentration etwa versechsfacht.

### **3.6 Verifikation der exprimierten Proteine**

#### **3.6.1 SDS-PAGE**

Die Expression jedes Pentonbasis-Proteins wurde kontrolliert durch Denaturierung und anschließende Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970).

Unter Verwendung des Acrylamid Denaturing Gel-Mix (Stratagene, Heidelberg) wurden 12 %-ige Trenngele und 4 %-ige Sammelgele gegossen. Der Gel-Mix beinhaltet eine vorbereitete Gellösung, die alle chemischen Bestandteile (Resolving Gel Buffer: 0,375 M Tris, pH8,8; 0,1 % SDS. Resolving Gel Concentrate: 0,125 M Tris, pH6,8; 0,1 % SDS. 4 % Stacking Gel Mix) für die Polyacrylamidgele enthält. Zur Polymerisation von 10 ml des 12 %-igen Trenngels (6 cm) wurden 10 µl TEMED und 100 µl Ammoniumpersulfat zugegeben. Die Lösung wurde zum Schutz vor Verdunstung und zum Ausgleich des Meniskus mit Butanol überschichtet. Anschließend wurde ein ca. 1 cm langes, 4 %-iges Sammelgel gegossen.

Die Proteinproben (20 µl, entsprechend ca. 1–2 µg Protein) wurden in 20 µl 2x SDS-Gel Loading Puffer (250 mM Tris, 500 mM DTT, 10 % SDS, 0,5 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin) aufgenommen und 7 min bei 95 °C denaturiert.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der denaturierten Pentonbasis-Proteine in Elektrophorese-Puffer (24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH8,3) bei 200 mA und 150 V für 1 h wurde das »Mini-V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System« des Herstellers Gibco BRL verwendet. Als Längenstandard diente die »Benchmark Prestained Protein Ladder« (Gibco BRL).

Nach Auftrennung der Proteine wurde das Gel nach der »Coomassie Blue«-Methode gefärbt. Dazu wurde das »Blueprint Fast-Page Stain«-Reagenz (Gibco BRL) verwendet. Nach drei Waschschritten von jeweils 10 min Dauer bei RT in Waschlösung (45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 45 % ddH<sub>2</sub>O) wurden die Gele 30 min bei RT in Farblösung (8 ml Blueprint-Stammlösung,

32 ml ddH<sub>2</sub>O, 10 ml Waschlösung) gefärbt. Nach einer Inkubation in 10 %-iger Essigsäure über 10 min wurden die Proteinbanden sichtbar (siehe Abbildung 12). Die Gele wurden abschließend für 20 min in 1 %-igem Glycerol fixiert und dann getrocknet.

### **3.6.2 Western-Blot**

Geringe Proteinmengen lassen sich mit der immunologischen Technik des Western-Blot nachweisen. Dazu werden die in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und so für die Reaktion mit einem anschließend zugegebenen spezifischen Antikörper zugänglich. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex auf der Nitrozellulosemembran lässt sich sichtbar machen, indem ein weiterer, markierter Antikörper addiert wird, der gegen den ersten gerichtet ist.

Der Nachweis der exprimierten Pentonbasis-Proteine erfolgte durch Einsatz eines Antikörpers gegen den im Expressionsvektor enthaltenen und von den M15-Zellen entsprechend exprimierten, am N-terminalen Ende der Proteine lokalisierten Anhang aus den Aminosäuren RGS (Arginin-Glycin-Serin) und nachfolgenden sechs Histidin-Resten (RGS(H)6).

Für das Blotting wurde erneut das »Mini-V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System« des Herstellers Gibco BRL eingesetzt. Als Marker und zur Kontrolle des Proteintransfers wurden vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards (Gibco BRL) verwendet.

Nach der SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.6.1) wurde das Gel 15 min in 50 ml kaltem Proteintransfer-Puffer (24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol; pH 8,3) equilibriert. Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran (Gibco BRL) erfolgte in Proteintransfer-Puffer über 60 min bei RT, 150 V und 150 mA. Anschließend wurde die Membran zweimal je 10 min in TBS-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 7,5) gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran in Blockierungslösung (3 % BSA in TBS-Puffer) bei RT über Nacht. Die Membran durchlief dann zwei weitere Waschschriffe über je 10 min



in TBST-T-Puffer (500mM NaCl, 0,05 % Tween, 20mM Tris-HCl, pH7,5, 0,2 % Triton X-100) sowie einen über 10min in TBS-Puffer. Anschließend folgte die Inkubation der Nitrozellulosemembran in 30ml RGS-His-Antikörper-Lösung (15ml Blockierungspuffer, 15ml ddH<sub>2</sub>O mit 15µl RGS-His-Antikörper (Qiagen)) bei RT über 60min. Es schlossen sich drei Waschschriffe an, zweimal 10min in TBST-T-Puffer, einmal 10min in TBS-Puffer. Dann wurde die Membran über 60min bei RT in 30ml Blockierungslösung inkubiert, der 60µl Antikörperkonjugat (Anti-Maus-IgG-AP, mit alkalischer Phosphatase konjugiertes IgG (Boehringer, Mannheim)) zugesetzt waren. Es folgten vier weitere Waschschriffe von 10min mit TBST-T-Puffer. Die Membran wurde dann mit ddH<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit 10ml BM Purple AP Substrat (Boehringer, Mannheim), welches die Antigen-Antikörperbindung sichtbar macht, über 30min gefärbt. Das Resultat des Western-Blot ist in Abbildung 13 dargestellt.

### **3.7 Infektion von Zellkulturen**

Konfluierende HeLa-Zell-Monolayer in 96-Proben-Platten wurden zunächst mit PBS gewaschen, anschließend wurde jedem Zellansatz 200µl Minimum Essential Medium (MEM) ohne Kälberserum zugefügt.

Pro Ansatz wurden jeweils 20µl in Phosphatpuffer gelöstes Pentonbasis-Protein (entsprechend ca. 200ng Protein) aufgetragen.

Nach Inkubation über vier Stunden bei 37°C in einer 5%-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden die Platten nativ lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen der Zellkulturen im Sinne eines frühen CPE untersucht (siehe Abbildung 14 a–d).

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Die Sequenz der Ad8-Pentonbasis

Der die Ad8-Pentonbasis kodierende DNA-Abschnitt wurde mit der Didesoxy-Methode sequenziert. Nachfolgend ist die Basenabfolge mit der entsprechenden Aminosäure-Sequenz darunter aufgelistet.

Die Sequenz wurde unter der Zugangsnummer AJ 249343 in die EMBL-Datenbank eingelesen.

ATG	AGG	CGC	GCG	GTG	GTG	TCC	TCT	CCT	CCT	CCC	TCG	TAC	GAA	AGC	GTG	ATG	GCG
<b>Start</b>	R	R	A	V	V	S	S	P	P	P	S	Y	E	S	V	M	A
CAG	GCG	ACC	CTG	GAG	GTT	CCG	TTT	GTG	CCT	CCG	CGG	TAT	ATG	GCT	CCT	ACG	GAG
Q	A	T	L	E	V	P	F	V	P	P	R	Y	M	A	P	T	E
GGC	AGA	AAC	AGC	ATT	CGT	TAC	TCG	GAG	CTG	GCT	CCG	CAG	TAC	GAC	ACC	ACT	CGC
G	R	N	S	I	R	Y	S	E	L	A	P	Q	Y	D	T	T	R
GTG	TAC	TTG	GTG	GAC	AAC	AAG	TCG	GCG	GAC	ATC	GAT	TCC	CTC	AAC	TAC	CAA	AAC
V	Y	L	V	D	N	K	S	A	D	I	A	S	L	N	Y	Q	N
GAC	CAC	AGC	AAC	TTC	CTA	ACC	ACG	GTG	GTG	CAG	AAC	AAC	GAT	TTC	ACC	CCC	GCC
D	H	S	N	F	L	T	T	V	V	Q	N	N	D	F	T	P	A
GAG	GCC	AGC	ACG	CAG	ACG	ATA	AAT	TTT	GAC	GAG	CGG	TCC	CGG	TGG	GGC	GGT	GAT
E	A	S	T	Q	T	I	N	F	D	E	R	S	R	W	G	G	D
CTG	AAG	ACC	ATT	TTG	CAC	ACC	AAC	ATG	CCC	AAT	GTC	AAC	GAG	TAC	ATG	TTC	ACC
L	K	T	I	L	H	T	N	M	P	N	V	N	E	Y	M	F	T
AGC	AAG	TTT	AAG	GCG	CGG	GTG	ATC	GTG	GCT	AGG	AAG	CAC	CCA	CAG	GGG	GTA	GCT
S	K	F	K	A	R	V	M	V	A	R	K	H	P	Q	G	V	A
GAA	ACA	GAT	TTA	AGT	CAG	GAT	AAG	CTT	GAA	TAT	GAG	TGG	TTT	GAG	TTT	ACC	CTG
E	T	D	L	S	Q	D	K	L	E	Y	E	W	F	E	F	T	L
CCC	GAG	GGC	AAT	TTT	TCC	GAG	ACC	ATG	ACC	ATA	GAC	CTG	ATG	AAC	AAC	GCC	ATC
P	E	G	N	F	S	E	T	M	T	I	D	L	M	N	N	A	I
TTG	GAA	AAC	TAC	TTG	CAA	GTG	GGG	CGG	CAA	AAT	GGC	GTG	CTG	GAG	AGC	GAT	ATT
L	E	N	Y	L	Q	V	G	R	Q	N	G	V	L	E	S	D	I
GGA	GTT	AAG	TTT	GAC	AGC	AGA	AAT	TTC	AAG	CTG	GGC	TGG	GAC	CCG	GTG	ACT	AAG
G	V	K	F	D	S	R	N	F	K	L	G	W	D	P	V	T	K
CTG	GTG	ATG	CCG	GGG	GTC	TAC	ACA	TAC	GAG	GCC	TTC	CAT	CCC	GAC	GTG	GTG	CTG
L	V	M	P	G	V	Y	T	Y	E	A	F	H	P	D	V	V	L
CTG	CCG	GGC	TGC	GGG	GTG	GAC	TTC	ACC	GAG	AGC	CGC	CTG	AGC	AAC	CTT	CTG	GGC
L	P	G	C	G	V	D	F	T	E	S	R	L	S	N	L	L	G
ATT	CGC	AAG	AAG	CAA	CCT	TTC	CAA	GAG	GGC	TTC	AGG	ATT	ATG	TAT	GAG	GAT	CTA
I	R	K	K	Q	P	F	Q	E	G	F	R	I	M	Y	E	D	L
GAA	GGG	GGC	AAC	ATC	CCC	GCC	CTG	CTG	GAT	GTG	GAA	GCA	TAC	CTC	AAA	AGC	AAG
E	G	G	N	I	P	A	L	L	D	V	E	A	Y	L	K	S	K

AAT GAT CGG GAG GAA GCC ACC CAG AAT GCA AAC AGA GTT GCT GCA AAT GGA GGT  
 N D R E E A T Q N A N R V A A N G G  
 GGT GAA ATT AGG GGA GAT ACT TTT CTT ACC ACC GAA CAG CTA AGA GCC GCT GAC  
 G E I R G D T F L T T E Q L R A A D  
 AAG GAG CTG GTT ATT AAG CCC ATT AAG GAA GAT GCT AGC AAG AGA AGC TAT AAT  
 K E L V I K P I K E D A S K R S Y N  
 GTC ATA GGG GAC ACC CAT GAC ACC CTG TAC CGC AGC TGG TAC CTG TCC TAT ACC  
 V I G D T H D T L Y R S W Y L S Y T  
 TAC GGG GAC CCC GAG AAG GGG GTA CAG TCG TGG ACG CTG CTC ACC ACC CCC GAC  
 Y G D P E K G V Q S W T L L T T P D  
 GTC ACC TGC GGC GCG GAG CAA GTC TAC TGG TCG CTG CCG GAC CTC ATG CAA GAC  
 V T C G A E Q V Y W S L P D L M Q D  
 CCC GTC ACC TTC CGC TCC ACC CAG CAA GTC AGC AAC TAC CCC GTG GTT GGC GCC  
 P V T F R S T Q Q V S N Y P V V G A  
 GAG CTC ATG CCC TTC CGC GCC AAG AGC TTT TAC AAC GAT CTC GCC GTC TAC TCC  
 E L M P F R A K S F Y N D L A V Y S  
 CAG CTC ATC CGC AGC TAC ACC TCC CTC ACC CAC GTC TTC AAC CGC TTC CCC GAC  
 Q L I R S Y T S L T H V F N R F P D  
 AAC CAG ATC CTG TGT CGC CCG CCC GCG CCC ACC ATC ACC ACC GTT AGT GAA AAC  
 N Q I L C R P P A P T I T T V S E N  
 GTG CCT GCT CTC ACA GAT CAC GGG ACG CTA CCG CTG CGC AGC AGT ATC CGC GGA  
 V P A L T D H G T L P L R S S I R G  
 GTC CAG CGA GTG ACC GTT ACT GAC GCC CGT CGC CGC ACC TGT CCC TAC GTC TAC  
 V Q R V T V T D A R R R T C P Y V Y  
 AAG GCC CTG GGC ATA GTC GCG CCG CGC GTG CTC TCT AGT CGC ACC TTT TAA  
 K A L G I V A P R V L S S R T F **Stop**

## 4.2 Vergleich der Aminosäure-Sequenz verschiedener Ad-Serotypen

Die Aminosäure-Sequenz der Ad 8-Pentonbasis wurde denen ausgewählter anderer humaner Ad, deren Sequenzen verfügbar waren, sowie der des Geflügel-Ad (FAV)-Serotyps 10 gegenübergestellt (Sheppard und Trist, 1992; Bai et al., 1994; Cuzange et al., 1994; Akopian et al., 1996; Arnberg et al., 2000 a,b).

NNN

Ad 8	<b>1</b>	MRR- <b>AV</b> -----VSS <b>PPP</b> SYESV-----MAQAT-----LEV <b>PFVPPRY</b> -----MA <b>PT</b> EGRNSIR
Ad 2		M <b>QRA</b> AMY-----EEG <b>PPP</b> SYESVVAAPVAAALGSPFDAPLDP <b>PFVPPRY</b> -----LR <b>PT</b> GGRNSIR
Ad 3		MRRRAVLGGAVVYPEG <b>PPP</b> SYESV-----MQQAAMIQ-PPLEA <b>PFVPPRY</b> -----LA <b>PT</b> EGRNSIR
Ad 12		MRR- <b>A</b> VELQTVAF <b>PETPPP</b> SYETV-----MAAA-----P <b>PYVPPRY</b> -----L <b>GPT</b> EGRNSIR
FAV 10		M-WGLQPPTS <b>I</b> -- <b>PPP</b> <b>PPP</b> TELTPSTYPAMVNGYPPAASAQSCSSSGGQSELYMPLQ <b>RVMAPT</b> GGRNSIK

WAC QYSSANA

Ad 8	<b>71</b>	<b>YSEL</b> APQY <b>DTT</b> RVYLVDNKSADID-- <b>SLNYQNDH</b> <b>SNFL</b> TT <b>VVQ</b> NDFT <b>PAE</b> AST <b>QT</b> IN <b>F</b> DE <b>RS</b> <b>RWGGDLK</b>
Ad 2		<b>YSEL</b> APL <b>FDTT</b> RVYLVDNKS <b>TDV</b> ATT <b>SLNYQNDH</b> <b>SNFL</b> -- <b>VIQ</b> NDYS <b>PE</b> AST <b>QT</b> IN <b>L</b> DD <b>RS</b> HWGGDLK
Ad 3		<b>YSDV</b> SPLY <b>DTT</b> KL <b>YLVDNKS</b> ADIA-- <b>SLNYQNDH</b> <b>SNFL</b> TT <b>VVQ</b> NDFT <b>P</b> EA <b>ST</b> QT <b>IN</b> FDE <b>RS</b> RWGG <b>QLK</b>
Ad 12		<b>YSEL</b> SPLY <b>DTT</b> RVYLVDNKS <b>SD</b> IA-- <b>SLNYQNDH</b> <b>SNFL</b> -- <b>VVQ</b> NDYS <b>P</b> IE <b>AG</b> QT <b>IN</b> FDE <b>RS</b> RWGGDLK
FAV 10		<b>YRDY</b> TPCRN <b>TT</b> KL <b>FYVDN</b> KAS <b>D</b> IDT-- <b>Y</b> NKDAN <b>H</b> SN <b>F</b> RT <b>V</b> I <b>H</b> NQ <b>DL</b> DAD <b>T</b> A <b>A</b> TES <b>I</b> QLDN <b>RS</b> CWGGDLK

P ASG TIQ

Ad 8	<b>141</b>	<b>TIL</b> HTNMPNVN <b>EY</b> MF <b>TS</b> K <b>F</b> KARVM <b>V</b> ARKHPQ <b>G</b> ---VAETDLSQDK <b>L</b> E <b>Y</b> E <b>W</b> FE <b>F</b> TL <b>P</b> EG <b>N</b> F <b>S</b> ET <b>M</b> T <b>I</b> DL <b>M</b> N
Ad 2		<b>TIL</b> HTNMPNVN <b>E</b> MF <b>TN</b> K <b>F</b> KARVM <b>SS</b> RSLTKD-----KQ <b>V</b> EL <b>K</b> Y <b>E</b> W <b>V</b> E <b>F</b> TL <b>P</b> EG <b>N</b> Y <b>S</b> ET <b>M</b> T <b>I</b> DL <b>M</b> N
Ad 3		<b>TIM</b> HTNMPNVN <b>EY</b> MF <b>SN</b> K <b>F</b> KARVM <b>V</b> SRKAPEGVTVNDTYDHKEDI <b>L</b> K <b>Y</b> E <b>W</b> FE <b>F</b> I <b>L</b> PE <b>G</b> N <b>F</b> SAT <b>M</b> T <b>I</b> DL <b>M</b> N
Ad 12		<b>TIL</b> HTNMPNVN <b>D</b> MF <b>TT</b> K <b>F</b> KARVM <b>V</b> ARKT <b>N</b> NE-----G <b>Q</b> T <b>I</b> L <b>E</b> Y <b>E</b> W <b>A</b> E <b>F</b> VL <b>P</b> EG <b>N</b> Y <b>S</b> ET <b>M</b> T <b>I</b> DL <b>M</b> N
FAV 10		<b>TAVR</b> T <b>NC</b> PNV <b>SS</b> FFQ <b>S</b> NSV-- <b>R</b> VRMMWKRDP <b>P</b> T---STAPPSAVGSGY <b>S</b> VPGAQ <b>Y</b> PE <b>G</b> N <b>Y</b> AL <b>C</b> EL <b>I</b> DL <b>L</b> N

DFI NEDA PpuMI StuI  
↓ ↓ ↓ ↓ SHPDNNQQOD

Ad 8	<b>211</b>	<b>NAI</b> LEN <b>YL</b> Q <b>V</b> <b>GRO</b> NGVLESD <b>I</b> <b>G</b> V <b>K</b> F <b>D</b> SR <b>N</b> F <b>L</b> GW <b>D</b> P <b>V</b> TK <b>L</b> VM <b>P</b> GV <b>Y</b> T <b>Y</b> E <b>A</b> F <b>H</b> PD <b>V</b> LL <b>P</b> GC <b>G</b> V <b>D</b> F <b>T</b> ES <b>R</b> L
Ad 2		<b>NAI</b> VEH <b>YL</b> K <b>V</b> <b>GR</b> QNGVLESD <b>I</b> <b>G</b> V <b>K</b> F <b>D</b> TR <b>N</b> F <b>R</b> L <b>G</b> W <b>D</b> P <b>V</b> T <b>G</b> L <b>V</b> M <b>P</b> GV <b>Y</b> T <b>N</b> E <b>A</b> F <b>H</b> PD <b>I</b> LL <b>P</b> GC <b>G</b> V <b>D</b> F <b>T</b> H <b>S</b> R <b>L</b>
Ad 3		<b>NAI</b> IDN <b>YL</b> E <b>I</b> <b>GR</b> QNGVLESD <b>I</b> <b>G</b> V <b>K</b> F <b>D</b> TR <b>N</b> F <b>R</b> L <b>G</b> W <b>D</b> P <b>E</b> T <b>K</b> L <b>I</b> M <b>P</b> GV <b>Y</b> T <b>Y</b> E <b>A</b> F <b>H</b> PD <b>I</b> VLL <b>P</b> GC <b>G</b> V <b>D</b> F <b>T</b> ES <b>R</b> L
Ad 12		<b>NAI</b> IEH <b>YL</b> R <b>V</b> <b>GR</b> QHG <b>V</b> LESD <b>I</b> <b>G</b> V <b>K</b> F <b>D</b> TR <b>N</b> F <b>R</b> L <b>G</b> W <b>D</b> P <b>E</b> T <b>Q</b> L <b>V</b> T <b>P</b> GV <b>Y</b> T <b>N</b> E <b>A</b> F <b>H</b> PD <b>I</b> VLL <b>P</b> GC <b>G</b> V <b>D</b> F <b>T</b> ES <b>R</b> L
FAV 10		<b>E</b> G <b>I</b> V <b>Q</b> L <b>YL</b> SE <b>GR</b> Q <b>NN</b> V <b>Q</b> K <b>S</b> D <b>I</b> <b>G</b> V <b>K</b> F <b>D</b> TR <b>N</b> F <b>G</b> LL <b>R</b> D <b>P</b> V <b>T</b> G <b>L</b> V <b>T</b> P <b>G</b> T <b>Y</b> V <b>Y</b> K <b>Y</b> H <b>P</b> D <b>I</b> VLL <b>P</b> GC <b>A</b> I <b>D</b> F <b>T</b> Y <b>S</b> R <b>L</b>

QES ST StuI NheI  
↓ ↓ ↓

Ad 8	<b>281</b>	<b>SNL</b> L <b>G</b> I <b>R</b> K <b>R</b> K <b>Q</b> P <b>F</b> Q <b>E</b> G <b>F</b> R <b>I</b> M <b>Y</b> E <b>D</b> L <b>E</b> G <b>G</b> N <b>I</b> P <b>A</b> L <b>L</b> D <b>V</b> E <b>A</b> Y <b>L</b> K <b>S</b> K <b>N</b> D <b>R</b> E <b>E</b> -----AT
Ad 2		<b>SNL</b> L <b>G</b> I <b>R</b> K <b>R</b> Q <b>P</b> F <b>Q</b> E <b>G</b> F <b>R</b> I <b>T</b> Y <b>D</b> D <b>L</b> E <b>G</b> G <b>N</b> I <b>P</b> A <b>L</b> L <b>D</b> V <b>D</b> A <b>Y</b> Q <b>A</b> S <b>L</b> K <b>D</b> D <b>T</b> E <b>Q</b> G <b>D</b> G <b>A</b> G <b>G</b> N <b>N</b> S <b>G</b> S <b>G</b> A <b>E</b> N <b>S</b> N <b>A</b> A
Ad 3		<b>SNL</b> L <b>G</b> I <b>R</b> K <b>R</b> H <b>P</b> F <b>Q</b> E <b>G</b> F <b>K</b> I <b>M</b> Y <b>E</b> D <b>L</b> E <b>G</b> G <b>N</b> I <b>P</b> A <b>L</b> L <b>D</b> V <b>T</b> A <b>Y</b> E <b>E</b> S <b>K</b> K <b>D</b> T <b>T</b> -----E <b>T</b> T <b>T</b>
Ad 12		<b>SN</b> I <b>L</b> G <b>I</b> R <b>K</b> R <b>Q</b> P <b>F</b> Q <b>E</b> G <b>F</b> V <b>I</b> M <b>Y</b> E <b>H</b> L <b>E</b> G <b>G</b> N <b>I</b> P <b>A</b> L <b>L</b> D <b>V</b> K <b>K</b> Y <b>E</b> N <b>S</b> L <b>Q</b> D <b>Q</b> N <b>T</b> -----
FAV 10		<b>S</b> LL <b>L</b> G <b>I</b> G <b>K</b> R <b>E</b> P <b>Y</b> S <b>K</b> G <b>F</b> V <b>I</b> T <b>Y</b> E <b>D</b> L <b>Q</b> G <b>G</b> D <b>I</b> P <b>A</b> L <b>L</b> D <b>L</b> D-----

RAE/DGEA/EILDV SacI NheI GYI  
↓ ↓ ↓

Ad 8	<b>351</b>	<b>Q</b> NAN <b>R</b> VAANGG <b>E</b> I <b>RGD</b> T <b>F</b> L <b>T</b> T <b>E</b> Q <b>L</b> R <b>A</b> -----AD <b>K</b> E <b>L</b> V <b>I</b> K <b>P</b> I <b>K</b> E <b>D</b> A <b>S</b> K <b>R</b> S <b>Y</b> N <b>V</b> I <b>G</b>
Ad 2		<b>A</b> AM <b>Q</b> P <b>V</b> E <b>D</b> M <b>N</b> D <b>H</b> A <b>I</b> <b>RGD</b> T <b>F</b> A <b>T</b> R <b>A</b> E <b>E</b> K <b>R</b> A <b>E</b> A <b>E</b> A <b>A</b> A <b>E</b> A <b>A</b> P <b>A</b> A <b>Q</b> E <b>V</b> E <b>K</b> P <b>Q</b> K <b>P</b> V <b>I</b> K <b>P</b> L <b>T</b> E <b>D</b> S <b>K</b> R <b>S</b> Y <b>N</b> L <b>I</b> S
Ad 3		<b>L</b> AV <b>A</b> E <b>E</b> T <b>S</b> E <b>D</b> D <b>D</b> I <b>T</b> <b>RGD</b> T <b>Y</b> I <b>T</b> E <b>Q</b> - <b>K</b> R <b>-E</b> A <b>A</b> A <b>E</b> V <b>K</b> K <b>E</b> L <b>K</b> I <b>Q</b> P-----L <b>E</b> K <b>D</b> S <b>K</b> R <b>S</b> Y <b>N</b> V <b>L</b> E
Ad 12		----- <b>V</b> R <b>G</b> D <b>N</b> F <b>I</b> A-----LN <b>K</b> A <b>A</b> R <b>I</b> E <b>P</b> V <b>E</b> T <b>D</b> P <b>K</b> G <b>R</b> S <b>Y</b> N <b>L</b> L <b>P</b>
FAV 10		----- <b>S</b> V <b>D</b> V <b>N</b> D <b>A</b> D <b>G</b> E <b>V</b> I <b>E</b> -----L <b>D</b> N <b>A</b> A <b>P</b> -----L <b>L</b> H <b>D</b> S <b>A</b> G <b>V</b> S <b>Y</b> N <b>V</b> I <b>Y</b>



**Abb. 11:** Vergleichende Aufstellung der Aminosäure-Sequenz. Deletionen sind durch Striche (-) dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuren auf der linken Seite der Abbildung berücksichtigt die aus der vergleichenden Gegenüberstellung resultierenden Deletionen. Die Sequenzanteile der Ad8-Pentonbasis, die für Mutationen ausgewählt wurden, sind unterstrichen und fett gedruckt, darüber sind die korrespondierenden Mutationen dargestellt. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen PpuMI, StuI, NheI und SacI sowie die Abbruchstelle von 8P-Tr sind durch Pfeile markiert. Rot dargestellt sind Sequenzhomologien der humanen Ad, blau entsprechende homologe Abschnitte des FAV.

Die Ad8-Pentonbasis setzt sich zusammen aus 520 Aminosäuren. Verglichen mit den Sequenzen von Ad2, Ad3 und FAV10 finden sich bei Ad8 Deletionen von 51, 24 bzw. 5 Aminosäuren. Im Gegensatz dazu ist die Ad8-Pentonbasis 23 Aminosäuren länger als die von Ad12. Die höchste Übereinstimmung bezüglich der Aminosäure-Sequenz findet sich zwischen Ad8 und Ad3, die größte Diversität erwartungsgemäß zwischen Ad8 und dem Geflügel-Adenovirus FAV10.

Virus	Sequenzübereinstimmung mit der Ad8-Pentonbasis insgesamt [%]	Sequenzübereinstimmung in der zentralen Region [%]	Länge (AS)
Ad 2	70	37	571
Ad 3	77	46	544
Ad 12	74	32	497
FAV 10	43	30	525

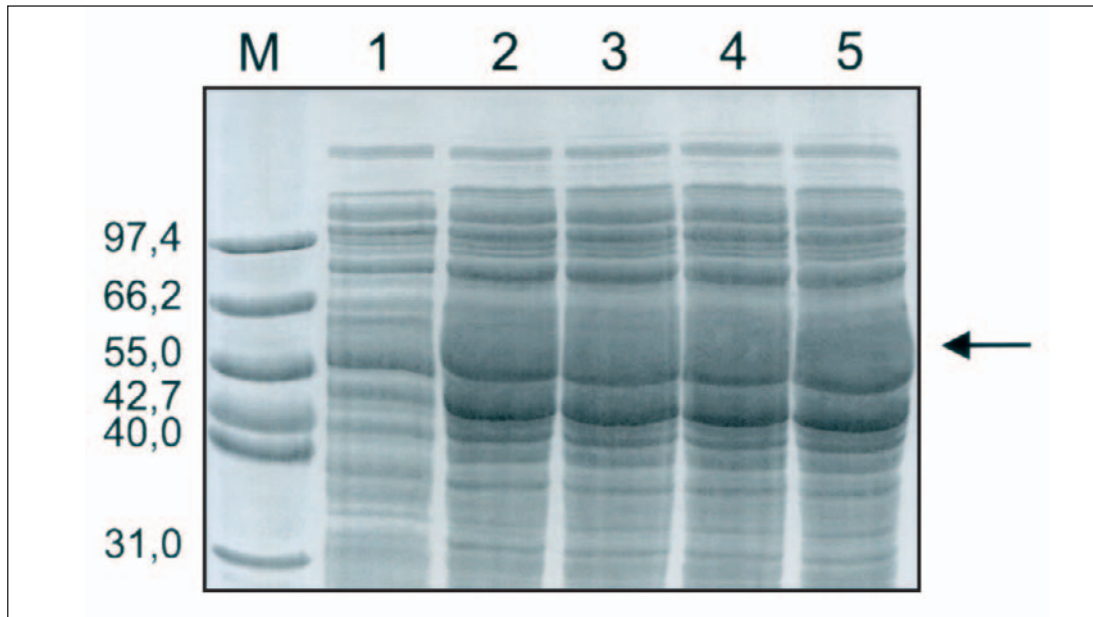
**Tab. 7:** AS-Sequenzhomologie des Pentonbasis-Proteins von Ad8 mit anderen humanen Ad und einem Geflügel-Ad.

Die Variationen von Länge und Aminosäure-Abfolge der Polypeptidketten scheinen sich nicht zufällig über das gesamte Pentonbasis-Protein zu

erstrecken, sondern liegen größtenteils in der zentralen Region. Diese Beobachtung stimmt überein mit vorherigen vergleichenden Untersuchungen, die belegten, daß die N- und C-terminalen Regionen der Pentonbasis-Proteine verschiedener Adenovirus-Serotypen sehr ähnlich sind und in weiten Teilen übereinstimmen, während die von ihnen flankierte zentrale Region hochvariabel ist (Mathias et al., 1994).

#### **4.3 Expression der rekombinanten Pentonbasis-Proteine**

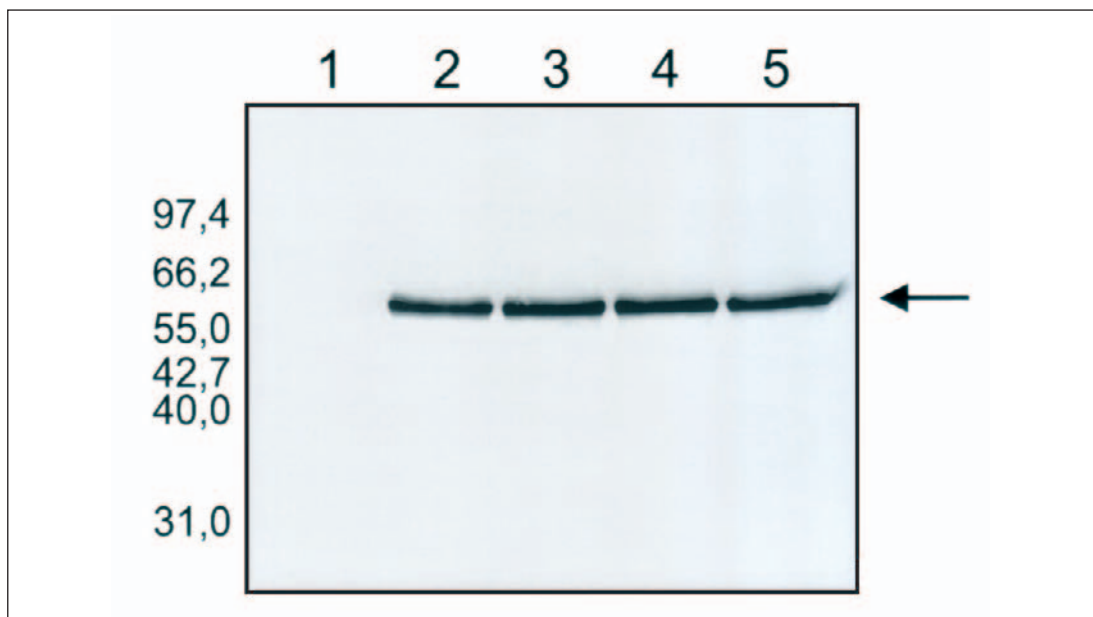
Die Expression jedes Pentonbasis-Proteins wurde kontrolliert durch Denaturierung und anschließende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE). Vor Auftragen auf die SDS-Gele wurden die Proben durch Erhitzen denaturiert. Die exprimierten Proteine stellten sich als diskrete Banden von ca. 59 kD in der denaturierenden SDS-PAGE sowie im Western-Blot dar (Abbildung 12 und 13). Die 59 kD-Bande repräsentiert hierbei die monomere Form der Pentonbasis. Die verkürzten bzw. deletierten Proteine zeigten eine molekulare Masse zwischen ca. 57 kD (8 P-Tr) und 42 kD (8 P-PpuMI). Diese Resultate stimmen überein mit den anhand der Aminosäure-Sequenz des Pentonbasis-Proteins einschließlich des RGS(H)6-Epitops des Expressionsvektors pQE 32 erwarteten molekularen Massen.



**Abb. 12:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE (8%) der im E. coli-Derivat M15 exprimierten rekombinanten Pentonbasis-Proteine. Der Pfeil markiert die Position der monomeren Pentonbasis.

**M:** Molekularer Längenstandard (der Maßstab in kD ist auf der linken Seite angegeben)

- 1:** Nicht induzierte, mit pQE 32 transformierte M15-Zellen      **2:** Pentonbasis-Protein 8 P  
**3:** Pentonbasis-Protein 8 P-RAE      **4:** Pentonbasis-Protein 8 P-S(HPD)NNQQ  
**5:** Pentonbasis-Protein 8 P-DGEA



**Abb. 13:** Western-Blot. Ein anhand eines mitgelaufenen Längenstandards bestimmter Maßstab ist am linken Bildrand dargestellt. Der Pfeil weist auf die Bande der monomeren Pentonbasis.

- 1:** Nicht induzierte, mit pQE 32 transformierte M15-Zellen      **2:** Pentonbasis-Protein 8 P  
**3:** Pentonbasis-Protein 8 P-RAE      **4:** Pentonbasis-Protein 8 P-S(HPD)NNQQ  
**5:** Pentonbasis-Protein 8 P-DGEA

#### **4.4 Mit dem frühen CPE assoziierte Domänen der Pentonbasis**

Die Vergleiche der verfügbaren Aminosäure-Sequenzen mehrerer Pentonbasis-Proteine ergaben mehrere konservierte Domänen, welche die hypervariable zentrale Region flankieren. Um zu untersuchen, welche dieser Domänen an der Induktion von Veränderungen der Wirtzellmorphologie im Sinne eines frühen CPE beteiligt sind, wurden mittels Primer-vermittelter Mutagenese dieser konservierten Bereiche 23 Punktmutationen enthaltende Pentonbasis-Proteine hergestellt. Zusätzlich wurden insgesamt fünf Mutationen konstruiert, die Deletionen im Bereich der hypervariablen zentralen Region bzw. davor oder danach aufwiesen.

Die für eine Punktmutation ausgewählten Aminosäuren waren gleichmäßig über das Pentonbasis-Protein verteilt und in Regionen lokalisiert, in denen die Sequenzen der verglichenen humanen Ad-Serotypen Übereinstimmungen aufwiesen. Mit Ausnahme der Variationen des RGD-Motivs und der Mutation 8 P-GYI, die in der zentralen, hypervariablen Region lokalisiert waren, lagen die Mutationen in den konservierten Bereichen der Pentonbasis, 12 N-terminal und sieben C-terminal.

Die Mutationen wurden so gewählt, daß die ursprünglichen Aminosäuren durch solche mit divergenten biochemischen Eigenschaften ersetzt wurden, beispielsweise wurden hydrophile gegen hydrophobe bzw. polare gegen unpolare Aminosäuren ausgetauscht.

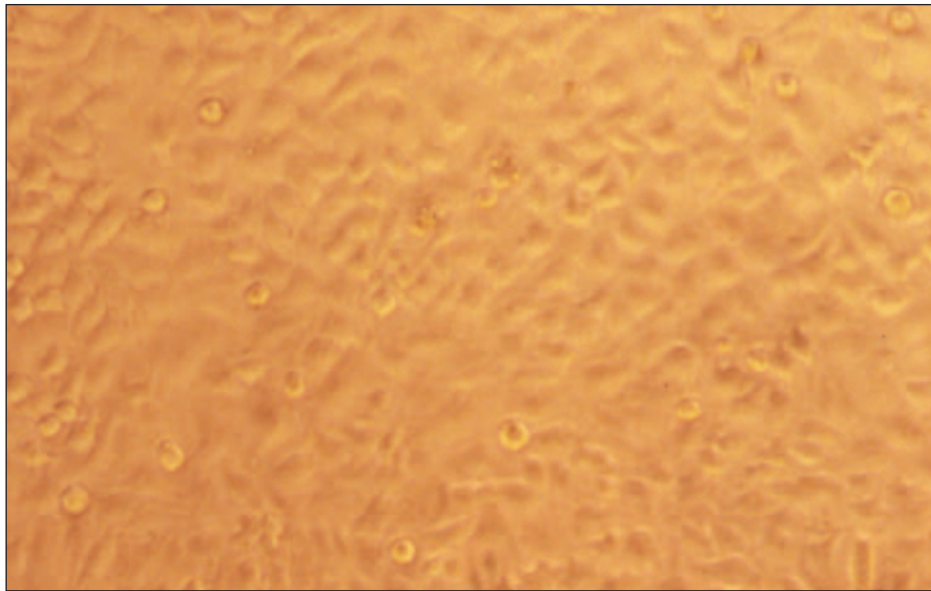
Von den punktmultierten rekombinanten Proteinen waren mit Ausnahme von vier Mutanten alle exprimierten Proteine in der Lage, in den HeLa-Zellkulturen cytopathogene Veränderungen wie Zellabrundungen und Lösung aus Zellverbänden hervorzurufen.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß das rekombinante Pentonbasis-Protein mit der Variation des RGD-Triplets zu RAE seine Fähigkeit, einen frühen CPE auszulösen, verloren hat, wurden noch zwei weitere Mutationen dieses Motivs konstruiert, in denen die Sequenz RGD durch die ebenfalls als Integrin-Bindungsstellen bekannten Polypeptide EILDV und DGEA ersetzt wurde. Mit diesen Mutationen infizierte Zellkulturen

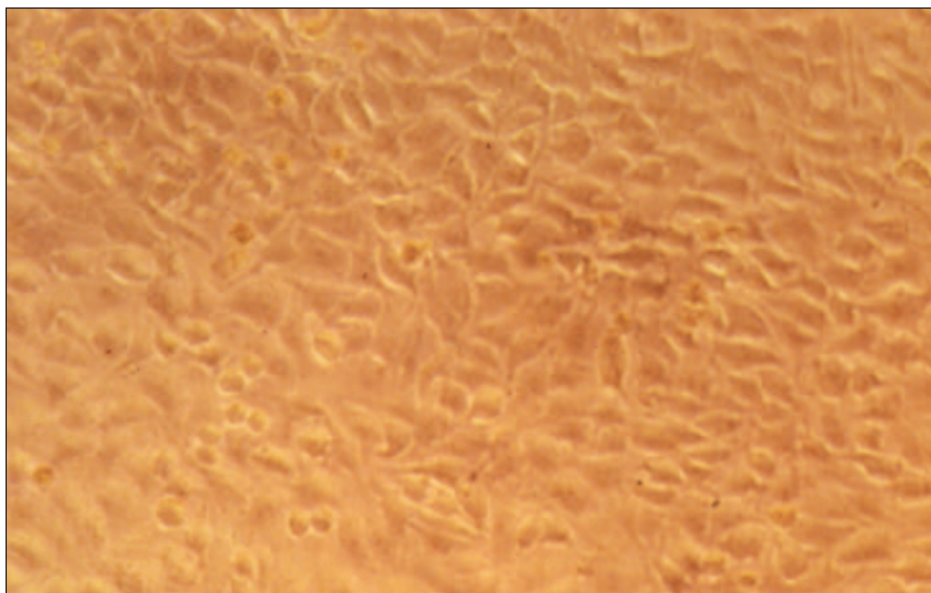


zeigten deutliche morphologische Veränderungen im Sinne eines frühen CPE.

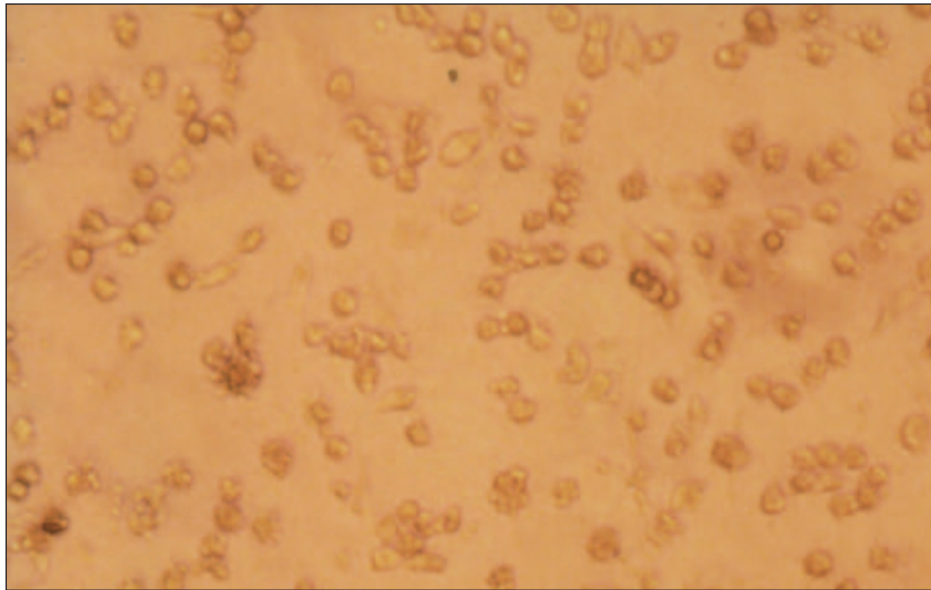
**Abb. 14 a–d:** Durch die rekombinanten Pentonbasis-Proteine induzierte Veränderungen der Morphologie der HeLa-Zellkulturen.



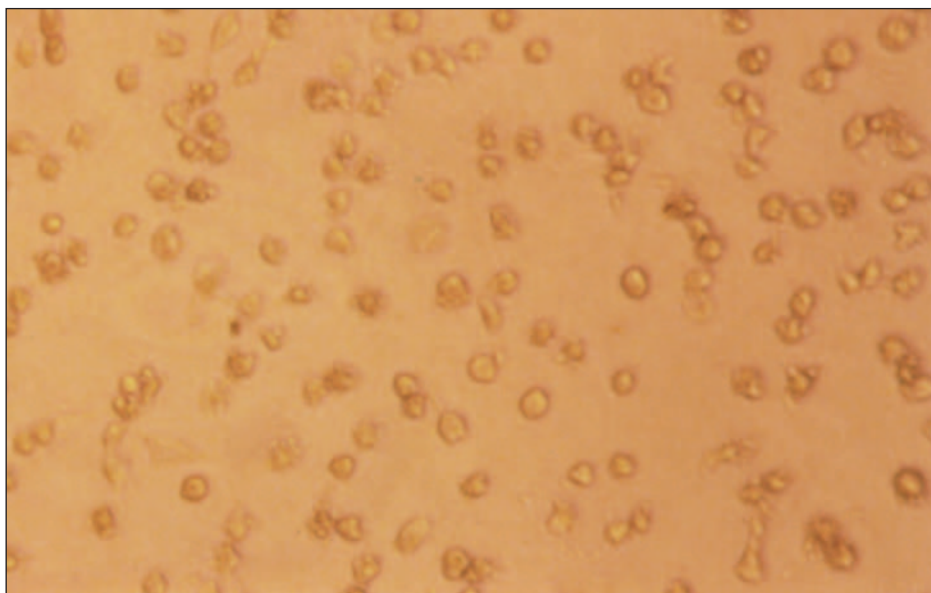
**Abb. 14 a:** Native Zellkultur.



**Abb. 14 b:** Zellen nach Exposition des rekombinanten Pentonbasis-Proteins 8P-RAE. Lichtmikroskopisch sind keine wesentlichen morphologischen Veränderungen im Sinne eines frühen CPE nachweisbar.



**Abb. 14 c:** Zellen nach Exposition des nativen, nicht mutierten Pentonbasis-Proteins 8P. Die Zellen zeigen sich deutlich abgerundet, der ursprüngliche Zellrasen ist aufgelöst.



**Abb. 14 d:** Zellen nach Exposition des rekombinanten Pentonbasis-Proteins 8P-DGEA. Die Veränderungen entsprechen ebenfalls einem frühen cytopathischen Effekt.

<b>Mutant</b>	8P- NNN	8P- WAC	8P- QYSS	8P- ANAP	8P- ASG	8P- TIQ	8P- DFI	8P- NEDA	8P- S(HPD)NNQQ	8P- QD
<b>CPE</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<b>Mutant</b>	8P- QES	8P- ST	8P- RAE	8P- GYI	8P- FG	8P- MT	8P- QNE	8P- ATEA	8P- QS	8P- CT
<b>CPE</b>	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<b>Mutant</b>	8P- EDH	8P- PpuMI	8P- StuI	8P- NheI	8P- SacI	8P- Tr	8P- DGEA	8P- EILDV		
<b>CPE</b>	+	-	-	-	-	+	+	+		
+ : lichtmikroskopisch Nachweis eines frühen CPE										
- : lichtmikroskopisch kein Nachweis eines frühen CPE										

**Tab. 8:** Die Mutationen und ihre Fähigkeit, einen frühen CPE zu induzieren.

Es zeigte sich, daß die RGD-Sequenz des Ad 8-Pentons verantwortlich für die Auslösung des frühen CPE ist. Während das native Pentonbasis-Protein 8 P in der Lage war, Zellabrundungen und -loslösungen zu induzieren, zeigte die Mutation 8 P-RAE, der das RGD-Triplet fehlt, keine CPE-Aktivität. Somit treffen die für Ad2 gemachten Beobachtungen, daß die Veränderung des RGD-Tripeptids zu RAE die Fähigkeit der Pentonbasis zur Induktion des frühen CPE aufhebt (Bai et al., 1993; Karayan et al., 1997) auch für das Pentonbasis-Protein von Ad 8 des Subgenus D zu. In Übereinstimmung mit diesem Resultat waren die Mutationen 8 P-Nhe I und 8 P-PpuM I, denen die das RGD-Motiv tragende hypervariable zentrale Region fehlt, ebenfalls nicht in der Lage, in den Zellkulturen einen frühen CPE auszulösen.

Weiterhin wurde keine CPE-Aktivität beobachtet bei den drei Mutanten 8 P-S(HPD)NNQQ, 8 P-QES und 8 P-QNE.

In 8 P-S(HPD)NNQQ wurde die Originalsequenz FHPDVLL mutiert in SHPDNQQ. Während die Aminosäure-Abfolge HPD unverändert blieb, wurden die anderen fünf hydrophoben Aminosäuren gegen polare Vertreter ausgetauscht (Tabelle 9). Bei der Mutation 8 P-QES wurden alle im Original unpolaren, hydrophoben Aminosäuren durch polare ersetzt (LGI → QES), statt des neutralen Glycin wurde das saure Glutamat kodiert.

Bei der Mutation 8P-QNE wurden zwei unpolare hydrophobe Reste durch polare sowie mit Asparagin statt Aspartat eine saure durch eine neutrale Aminosäure ersetzt (PDV → QNE).

<b>Ad 8-Pentonbasis</b>	F	V	V	L	L		L	G	I		P	D	V
	+	+	+	+	+		+	#	+		-	*	#
<b>Ad 8-Pentonbasis mutiert zu</b>	S	N	N	Q	Q		Q	E	S		Q	N	E
+ : unpolar/hydrophob, neutral → polar/hydrophil, neutral    #: unpolar/hydrophob, neutral → polar/hydrophil, sauer - : unpolar/hydrophob, basisch → polar/hydrophil, neutral    *: polar/hydrophil, sauer → polar/hydrophil, neutral													

**Tab. 9:** Aminosäureaustausch der Domänen, deren Mutation im Verlust der Fähigkeit zur Induktion des frühen CPE resultierte.

Die Resultate wurden durch die korrespondierenden Deletionsmutanten 8P-StuI und 8P-SacI bestätigt. 8P-StuI fehlt die FHPDVWL- und die LGI-, 8P-SacI die PDV-Sequenz der Original-Pentonbasis. Beide rekombinanten Proteine zeigten sich unfähig, einen frühen CPE zu induzieren.

Während das LGI-Tripeptid in allen verfügbaren analysierten Pentonbasen absolut konserviert war, zeigten sich die PDV- und die FHPDVVLL-Sequenzen nur teilweise konstant bzw. konserviert. Die PDV-Sequenz war konserviert in Ad 2 (Roberts et al., 1984), Ad 5 (Neumann et al., 1988), Ad 12 (Sprengel et al., 1994) und PAV (porcine adenovirus) 3 (McCoy et al., 1996), aber nicht in Ad 3 (Cuzange et al., 1994), Ad 40 (Davison et al., 1993), OAV (ovine adenovirus) (Sudhanshu et al., 1996) und den Aviadenoviren FAV (fowl adenovirus) 1 (Akopian et al., 1996), FAV10 (Sheppard und Trist, 1992) und HEV (haemorrhagic enteritis virus) (Suresh et al., 1995). Bei Ad 3 ist die basische, hydrophobe Aminosäure Prolin (P) ausgetauscht gegen das neutrale, hydrophile Serin (S) (SDV), bei Ad 40 findet sich stattdessen das ebenfalls neutrale und hydrophile Threonin (T) (TDV).

In der Aminosäure-Sequenz der Pentonbasis des OAV ist das hydrophobe, unpolare Valin (V) ersetzt durch das ebenfalls hydrophobe und unpolare Isoleucin (I) (PDI), in FAV1 und FAV10 hingegen durch das hydrophobe Methionin (M) (PDM). Bei HEV variiert die PDV-Sequenz zu SDI.

Insgesamt ist auffällig, daß im Bereich dieses Tripeptids lediglich das saure und polare Aspartat (D) in allen verglichenen Serotypen konserviert ist.

Anstatt der unpolaren, hydrophoben Aminosäure Valin in der FHPDVVLL-Sequenz der Pentonbasis von Ad8 findet sich in den Pentonbasen der anderen menschlichen und Geflügel-Adenoviren größtenteils das ebenfalls unpolare Isoleucin (I). Bei PAV3 ist das zweite Leucin (L) durch ein ebenfalls hydrophobes Alanin (A) ersetzt. Das hydrophobe Phenylalanin (F) findet sich lediglich in den Mastadenoviridae konserviert, in den Aviadenoviridae ist es durch das saure, hydrophile Tyrosin (Y) ersetzt.

Alle drei Punktmutationen, durch die die Ad8-Pentonbasis ihre Fähigkeit zur Induktion des frühen CPE einbüßte, waren in den konservierten Regionen des Pentonbasis-Proteins lokalisiert. Allerdings ist auffällig, daß sich die Sequenzen relativ nah der zentralen hypervariablen Region befinden. Im Vergleich dazu beeinträchtigte die Mutation ähnlicher hydrophober Anteile, welche nicht in der Nähe der zentralen Region liegen, z. B. RWGG, IGVK oder VPA, nicht die Fähigkeit des rekombinanten Proteins, einen frühen CPE in den HeLa-Zellkulturen zu induzieren. Gleichermäßen hatte die Mutation der drei am N-terminalen Ende aufeinander folgenden Proline (PPP) keinen erkennbaren Einfluß auf die cytopathogene Aktivität der Ad8-Pentonbasis. Analog dazu findet sich in der C-terminalen Region der Pentonbasis eine hydrophobe PVV-Sequenz, die in allen Serotypen komplett konserviert ist, und die ebenfalls ohne konsekutiven Verlust der CPE-Aktivität verändert werden konnte (PV → QS).

Zwei mutierte Pentonbasis-Proteine, 8P-DGEA und 8P-EILDV, bei denen das Integrin-bindende RGD-Tripeptid der hypervariablen Region gegen die Sequenzen DGEA bzw. EILDV ausgetauscht wurde, wurden konstruiert. Beide rekombinanten Proteine zeigten zellabrundende Aktivität im Sinne eines frühen CPE. Dies impliziert, daß sie in Abwesenheit des RGD-Motivs in der Lage waren, an korrespondierende zelluläre Integrine zu binden. Abbildung 14 zeigt die entsprechenden HeLa-Zellkulturen, die den rekombinanten Penton-Proteinen 8P-RAE und 8P-DGEA ausgesetzt waren. Während bei der RGD-

Variation 8 P-RAE keine Veränderungen der Zellmorphologie festzustellen waren, die Kulturen sich von den nativen Zellen lichtmikroskopisch nicht wesentlich unterschieden, induzierten 8 P-DGEA und 8 P-EILDV deutliche Zellabrundungen sowie die Lösung der Zellen aus ihrem Verband.

DGEA dient als Erkennungssequenz der  $\alpha_1\beta_1$ -Integrine, EILDV wird von  $\alpha_3\beta_1$ - und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrinen erkannt. Während  $\alpha_1\beta_1$ - und  $\alpha_3\beta_1$ -Integrine auf verschiedenen Zelltypen weit verbreitet sind, finden sich  $\alpha_4\beta_7$ -Integrine vornehmlich auf aktivierten B- und T-Lymphozyten sowie auf Makrophagen. Die bisher bekannten zellulären Liganden für diese Integrine beinhalten unter anderem die in der Interzellulärmatrix befindlichen Zelladhäsionsproteine Kollagen (Integrin  $\alpha_1\beta_1$ ) und Fibronectin (Integrine  $\alpha_3\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_7$ ) (Hynes, 1992; Diamond und Springer, 1994).

Somit konnte demonstriert werden, daß die RGD-Domäne der Pentonbasis von Ad8 gegen andere Integrin-Erkennungsdomänen ausgetauscht werden kann, die Pentonbasis also auch mit anderen als den bisher zumeist beschriebenen  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen auf der Oberfläche von Wirtszellen zu interagieren vermag.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Die RGD-Domäne der Ad 8-Pentonbasis

Der Sequenzvergleich verschiedener Adenovirus-Serotypen zeigt eine relativ konservierte Aminosäureabfolge der Pentonbasis im Anfangs- und Endbereich, während die zentrale Region, die bei vielen Serotypen das RGD-Tripeptid aufweist, z.T. stark variiert (siehe Abbildung 11).

Hieraus lässt sich ein mögliches Strukturmodell der Pentonbasis ableiten, das aus zwei konservierten terminalen Domänen besteht, die durch eine Region variabler Länge miteinander verbunden sind. Die zentrale Region könnte sich, dem griechischen Buchstaben Omega ähnelnd, wie ein Einschub exponiert an der Oberfläche des Viruskapsids befinden. Diese Omega-Struktur entspricht vermutlich den Spikes, welche die Pentonbasis auf kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen aufweist (Stewart et al., 1997). Die RGD-Sequenz befindet sich etwa in der Mitte der hypervariablen Region und würde somit wahrscheinlich am distalen Ende der Spikes lokalisiert sein.

Eine zellabrundende und -lösende Aktivität isolierter Pentonbasis-Proteine in Zellkulturen im Sinne eines frühen cytopathischen Effektes ist bekannt für verschiedene Ad-Serotypen, einschließlich 3 und 11 (Subgenus B) sowie 1, 2, 5 und 6 (Subgenus C). Somit scheinen sich diese Serotypen ähnlicher oder sogar identischer Infektionsmechanismen über Fiber-Rezeptoren und RGD-Integrin-Interaktion zu bedienen. Bai et al. fanden Hinweise darauf, daß für Ad12 ein alternativer, Fiber-unabhängiger Infektionsweg existiert, dieser Serotyp scheint allein über das RGD-Peptid der Pentonbasis an Vitronektin-Rezeptoren der Wirtszelle andocken und diese infizieren zu können (Bai et al., 1994). Auch Ad2 scheint in Abwesenheit des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors Fiber-unabhängig über eine direkte Interaktion der Pentonbasis mit  $\beta_2$ -Integrinen an Wirtszellen binden zu können (Huang et al., 1996).

Kürzlich wurde zudem berichtet, daß das Integrin  $\alpha_3\beta_1$  als RGD-unabhängiger, alternativer Rezeptor für die Pentonbasis von Ad5 fungieren kann, auch in Zelltypen, die den Coxsackie- und Adenovirusrezeptor nicht exprimieren (Salone et al., 2003).

Möglicher biologischer Vorteil eines doppelten bzw. redundanten Rezeptor-Mechanismus für die Infektion wäre ein aus Integrin-vermittelter Signaltransduktion resultierender, beschleunigter Eintritt des Virions in die Wirtszelle. Die Zeit, in der adsorbierte Virionen Antikörpern und anderen zellulären oder humoralen Mechanismen des Immunsystems ausgesetzt sind, wäre reduziert. Zudem bedeutet eine größere Auswahl an Rezeptoren eine Erweiterung des Wirtszellspektrums.

In dieser Studie wurde die Pentonbasis-Sequenz von Ad8 ermittelt, sowie demonstriert, daß ihre RGD-Domäne in der zentralen, hypervariablen Region für das Auslösen des frühen CPE verantwortlich ist.

Die Mutation dreier bestimmter Domänen in der N- sowie der C-terminalen Region resultierten im Verlust der CPE-Aktivität. Legt man das oben genannte Strukturmodell der Pentonbasis zugrunde, kann angenommen werden, daß diese Domänen aufgrund ihrer Position im Protein nicht mit Rezeptorstrukturen der Wirtszelloberfläche interagieren, sondern eher die korrekte Faltung des Ad8-Pentonbasis-Polypeptids, oder, weil sie in der Nähe der hypervariablen Region lokalisiert sind, die Stabilisierung des RGD-Loops vermitteln. Insbesondere unpolare, hydrophobe Aminosäuren wie Valin (V), Isoleucin (I) und Leucin (L) könnten bei der Aufrechterhaltung der Integrität des entsprechenden Teils der Polypeptidkette der Pentonbasis in polarer Umgebung eine wichtige Rolle spielen. In dieser Hinsicht erscheint bemerkenswert, daß die VVLL-Reste in der Ad8-FHPDWLL-Sequenz zwar nicht in allen anderen Adenoviren, deren Sequenz verglichen wurde, komplett konserviert sind, sich aber an den entsprechenden Positionen stattdessen ebenfalls ausschließlich unpolare Aminosäuren finden. Folglich bleibt der hydrophobe Charakter dieser Region bei den Mastadenoviridae genauso konserviert wie bei den Aviadenoviridae. Diese Ergebnisse bestätigen bzw. unterstützen die Resultate von Karayan, die darauf hindeuten, daß das Ausmaß der Fähigkeit zur Infektion bzw. zur Schädigung von Zellkulturen auch von der Konformation und Quartärstruktur der rekombinanten Pentonbasis abhängt (Karayan et al., 1994).



Die Prolin-Aspartat-Valin (PDV)-Sequenz ist in den verglichenen Serotypen nicht hochkonserviert, scheint somit für die korrekte Faltung der Pentonbasis nicht unabdingbar zu sein; Ad2-Pentonbasis-Mutationen, denen diese Domäne fehlte, wiesen dennoch CPE-Aktivität auf (Bai et al., 1993).

Die hypervariable zentrale Domäne von Ad2 besteht vermutlich aus zwei langen  $\alpha$ -Helices, welche durch die RGD-Sequenz in einem  $\beta$ -»Turn« verbunden sind. Die Interaktion zwischen diesen beiden Helices könnte zur Stabilisierung der RGD-Domäne beitragen. Dies könnte erklären, daß die von Bai et al. konstruierten verkürzten Ad2-Pentonbasis-Mutationen, die ein Stop-Codon kurz nach der RGD-Sequenz aufwiesen, keine zellabrundende Aktivität zeigten (Bai et al., 1993).

In den Zelladhäsionsproteinen Tenascin und Fibronectin befindet sich die RGD-Sequenz in einem Loop, ähnlich wie in der vermuteten Sekundärstruktur der Pentonbasis (Copie et al., 1998). In Tenascin ist der Loop kürzer, deshalb kann der Fibronectin-Rezeptor nicht an das Tenascin-RGD binden. Möglicherweise ist analog hierzu die variable Länge der Polypeptidkette in der zentralen Region der Pentonbasis verschiedener Ad-Serotypen die Ursache für die Bindung des Virions an unterschiedliche Rezeptoren von Wirtszellen.

Unlängst wurde die Aminosäure-Sequenz der Ad17-Pentonbasis zugänglich gemacht (Kaus, M., 2004; GenBank, Zugangsnr. AF 108105). Zwischen der Pentonbasis von Ad17, einem Subgenus D II-Adenovirus und der Ad8-Pentonbasis besteht eine Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz von 92 %. Diese hohe Übereinstimmung beruht teilweise darauf, daß die zentrale Region der Ad17-Pentonbasis nur zwei Aminosäuren kürzer ist als die entsprechende Region von Ad8. Verglichen mit der Adenovirus-Fiber scheint die Länge der Pentonbasis innerhalb eines Subgenus nur relativ gering zu variieren. Im Gegensatz zu den anderen analysierten Pentonbasen sind alle Ad8-Regionen, die in dieser Studie für eine Mutation ausgewählt wurden, inklusive der PDV- und FHPDVVLL-Sequenzen, in Ad17 vollständig konserviert.

Frühere Studien mit Ad2 zeigten, daß die C-terminalen Reste RRR (AS 547-549), Y (AS 553) und K (AS 556) essentiell für die Pentamerisierung der

Pentonbasis sind (Karayan et al., 1994 und 1997). Dem in dieser Studie verwendeten rekombinanten Protein 8 P-Tr fehlten die letzten 50 C-terminalen Aminosäuren inklusive der RRR, Y und K-Reste. Ebenso wie die korrespondierenden Ad2-Mutanten mit Deletionen am carboxy-terminalen Ende konnte 8 P-Tr einen CPE initiieren. Aber im Gegensatz zu den rekombinanten Ad2-Mutationen von Karayan konnte für die Mutation 8 P-Tr in der nicht-denaturierenden SDS-Page und im Western-Blot eine deutliche, die pentamere Form der Pentonbasis repräsentierende Bande sichtbar gemacht werden, trotz des Fehlens dieser vermeintlich notwendigen C-terminalen Aminosäuren scheint 8 P-Tr weiterhin in der Lage zu sein, zu pentamerisieren. Die Erklärung für diesen Unterschied zwischen den Pentonbasis-Proteinen von Ad2 und Ad8 liegt möglicherweise in aus Variationen der primären Aminosäure-Sequenz resultierenden Konformationsänderungen der Pentonbasis. Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine hochgradige Mobilität der zentralen, Integrin-bindenden RGD-Vorwölbung der Ad2-Pentonbasis (Stewart et al., 1997), während die kürzere Ad12-Protrusion weniger flexibel zu sein scheint (Chiu et al., 1999). Der ausgedehntere Ad2-Loop erleichtert offenbar die Integrinbindung (Chiu et al., 1999). Weil die zentrale Region der Ad8-Pentonbasis 43 Aminosäuren kürzer als die entsprechende Region der Ad2-Pentonbasis ist, zeigt wahrscheinlich analog dazu der RGD-Loop von Ad8 ebenfalls weniger konformationelle Mobilität und weist deshalb eine relativ geringere Bindungskapazität für  $\alpha_v$ -Integrine auf.

## 5.2 Alternative Domänen

Variationen von Länge und Aminosäure-Sequenz der zentralen Pentonbasis-Region, sowie die Tatsache, daß einigen Adenoviren das RGD-Tripeptid fehlt, legen die Vermutung nahe, daß auch andere Domänen als das RGD-Motiv das Andocken des Virions an Integrine der Wirtszellen vermitteln können.

Bis jetzt ist nicht definitiv bekannt, welche Integrin-bindenden Domänen von Adenoviren benutzt werden, denen die RGD-Sequenz fehlt (z. B. Ad40, PAV3,

Aviadenoviridae). Eine LDV-Domäne am Beginn der zentralen Region wird als mögliche zweite Bindungsstelle diskutiert und begünstigt auch die Zelandock-Aktivität der Ad 2-Pentonbasis (Karayan et al., 1997), aber ebenso wie die RGD-Sequenz ist diese Domäne nicht in allen Adenoviren konserviert (z. B. PAV 3, FAV1, FAV10).

Die Tatsache, daß die Fiber-Coxsackie-Adenovirusrezeptor- und die Pentonbasis-Integrin-Interaktion synergistische Effekte auf das Eindringen von Adenovirus-Vektoren sowie auf die anschließende Expression transgener Produkte zeigen (Hidaka et al., 1999), läßt vermuten, daß alle Adenoviren an zelluläre Integrine binden, möglicherweise über bis heute nicht vollständig identifizierte Erkennungssequenzen. In jedem Fall konnte in dieser Studie gezeigt werden, daß es möglich ist, die RGD-Domäne durch andere (bereits bekannte) Integrin-Erkennungs-Domänen auszutauschen, ohne die Fähigkeit zur Infektion zu verlieren. Diese Beobachtung könnte von Bedeutung sein für die Auswahl und Weiterentwicklung von Adenoviren als Vektoren in der Gentherapie.

### **5.3 Mögliche Konsequenzen für die Weiterentwicklung von Adenovirus-basierten Vektoren**

#### **5.3.1 Gegenwärtige Problematik der Ad-basierten Gentherapie**

Das perfekte Vektorsystem für die Gentherapie würde zielgerichtet und spezifisch nur bestimmte Zellen innerhalb eines bestimmten Gewebes infizieren und würde über einen definierten Zeitraum therapeutische Mengen transgener Produkte exprimieren.

Nach den Retroviren sind die Adenoviren die gegenwärtig am häufigsten eingesetzten Vektoren für den Gentransfer. Adenoviren weisen eine Reihe von Eigenschaften auf, die sie für den Einsatz in der Gentherapie prädestinieren:

1. ubiquitäres Vorkommen
2. breites Wirtzellspektrum
3. relativ effizienter Gentransfer
4. geringe Pathogenität

5. relativ große Mengen an Fremd-DNA können integriert werden (bis zu 7,5 kB)
6. ein relativ stabiles virales Genom, eingefügte Fremdgene persistieren in der Regel unverändert auch nach wiederholten Zyklen viraler Replikation
7. Ad-Vektoren sind unter Einsatz rekombinanter DNA-Techniken relativ einfach und effizient zu manipulieren

Das adenovirale Genom besteht aus etwa 36 kB doppelsträngiger DNA. Nach Eintritt des Virions in den Nucleus werden zuerst Gene der frühen Region 1 (E1a und E1b) transkribiert. Während der frühen Phase der viralen Replikation werden vier nicht aufeinander folgende Regionen des Genoms (E1 bis E4) exprimiert. Diese dienen unter anderem als Transkriptionsregulatoren, die den Prozess der viralen Genexpression, die zur Replikation des Genoms führt, starten. Nach dem Beginn der Replikation des Virusgenoms treibt der »Major Late Promotor« die Transkription weiter voran. Virus-kodierte Funktionen lassen sich trennen in cis- und trans-Elemente. Während die cis-Gene, beispielsweise diejenigen, die für den Ursprung der Replikation oder die Verpackungssignale zur Kondensation der DNA verantwortlich sind, grundsätzlich vom Virus selbst getragen werden müssen, können die trans-Gene durch eingefügte Fremd-DNA ergänzt oder ersetzt werden.

Wenigstens drei Regionen des Virusgenoms können genetisches Fremdmaterial in Form von Insertionen oder Substitutionen aufnehmen: eine Region in E1, eine Region in E3 sowie eine kurze Region zwischen E4 und dem Ende des Genoms. Bei den Vektoren der ersten Generation wurde die E1-Region entfernt, um Platz für therapeutisches Genmaterial zu schaffen und um die virale Replikation zu unterdrücken. Dennoch wurden jedoch geringe Mengen an Virus-DNA transkribiert, eine Immunantwort des Wirtes wurde ausgelöst. Durch die durch diese Immunantwort vermittelte Zerstörung der transduzierten Zellen wurde die Zeitdauer der Genexpression entscheidend verkürzt. Diese ausgeprägte Immunantwort entsprach dem hauptsächlichen Rückschlag der frühen adenoviralen Gentherapie.

Die aktuell eingesetzten Ad-Vektoren der zweiten und dritten Generation weisen Deletionen verschiedener E1-, E2- und E4-Gene auf, weil nachgewiesen werden konnte, daß die durch diese DNA-Sequenzen kodierten Virusproteine den Großteil der Immunantwort induzieren (Gao et al., 1996; Lusky et al., 1997; Hodges et al., 2001). Diese neuen Vektoren zeichnen sich aus durch verringerte Toxizität und prolongierte Genexpression in vivo.

Dennoch bleibt eine entscheidende Limitation bestehen: Durch die Bildung neutralisierender Antikörper im Wirtorganismus ist bei wiederholter Anwendung eines rekombinanten adenoviralen Vektors ein effizienter Gentransfer nicht zu erzielen.

Beim durch adenovirale Vektoren vermittelten Gentransfer findet keine Insertion des genetischen Fremdmaterials in das Wirtgenom statt. Somit ist die Wahrscheinlichkeit, essentielle zelluläre Abläufe zu stören, gering. Andererseits sind allerdings auch die gentherapeutischen Anwendungen der adenoviralen Vektoren auf Strategien beschränkt, die nur eine temporäre Proteinexpression erforderlich machen. Weil die virale DNA aus der Wirtszelle verschwindet, muß bei der Behandlung chronischer Erkrankungen wie z. B. der Cystischen Fibrose die Applikation in bestimmten Intervallen wiederholt werden. Wenn allerdings genau diese, zeitlich begrenzte Aktivität erwünscht ist, z. B. um das Immunsystem gegen maligne Zellen zu aktivieren oder apoptotische Stimuli zu induzieren, sind diese nicht-integrierenden Vehikel Mittel der Wahl.

Im September 1999 starb ein 18-jähriger Patient mit Ornithincarbamyltransferase-Mangel in der Universitätsklinik von Pennsylvania/USA an den unmittelbaren Folgen einer Gentherapie. Ein replikationsdefizienter Ad-Vektor der ersten Generation, appliziert über die Arteria hepatica, wurde verwendet, um die DNA-Sequenz des dem Patienten fehlenden Enzyms zu transduzieren. Offenbar bedingt durch die sehr hohe eingesetzte Virusmenge kam es zu einer massiven Immunantwort des Patienten, die in einem letalen Multiorganversagen gipfelte.

Aufgrund dieses Zwischenfalls wurden einige Aspekte der Gentherapie neu überdacht. Es wurden Vektoren entwickelt, die weitergehende Deletionen von

die Immunabwehr des Wirtes stimulierenden Virusproteinen aufweisen. Außerdem wird der zu applizierenden Vektordosis und der Grunderkrankung bzw. den Organfunktionen des Patienten größere Bedeutung beigemessen (Benihoud et al., 1999; Breyer et al., 2001; Vorburger und Hunt, 2002).

Die gegenwärtige Generation von Adenovirus-Vektoren weist dennoch immer noch einige entscheidende Nachteile auf, die ihren Einsatz in der Gentherapie limitiert:

Der Vektor induziert z.T. erhebliche entzündliche Reaktionen des Wirtes, die fatale Auswirkungen haben können (Otake et al., 1998; Harvey et al., 1999; Czichon et al., 2001; Ritter et al., 2002; Vorburger und Hunt, 2002). Zudem wird, trotz weitgehender Deletion viraler Gene, durch die Vektoren, durch von der Wirtszelle exprimierte virale Proteine sowie durch die transduzierte Zelle selbst eine bisweilen erhebliche Immunantwort des Wirtes ausgelöst, die die Effektivität der Transduktion limitiert und unter anderem praktisch ausschließt, den gleichen Vektor wiederholt zu applizieren (Yang et al., 1994, 1996; Mastrangeli et al., 1996; Gahery-Segard et al., 1997).

Adenoviren infizieren eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen. Eine selektive Lieferung von genetischem Fremdmaterial in bestimmte Zielgewebe ist bislang kaum möglich. Dieser breite Wirtzelltropismus vieler Serotypen beeinträchtigt sowohl die Sicherheit, als auch die Effizienz aktueller Gentherapie-Protokolle (Goodman et al., 1996; Bui et al., 1997).

Adenovirus-Vektoren sind bisher kaum in der Lage, Zellen zu infizieren, die entsprechende primäre Rezeptoren, insbesondere den Coxsackie- und Adenovirusrezeptor, nicht oder nicht ausreichend exprimieren (Zabner et al., 1997; Pickles et al., 1998; Dmitriev et al., 2000; Havenga et al., 2001).

### **5.3.2 Retargeting**

Um einen verbesserten Ad-Vektor zu entwickeln, muß zunächst ein Retargeting ermöglicht werden, der native, »promiskuitive« Tropismus der Adenoviren muß inaktiviert und stattdessen ein neuer Tropismus induziert werden, der die selektive Infektion und Transduktion bestimmter Zelltypen

ermöglicht, eingeschlossen solche Gewebe, die normalerweise aufgrund des Fehlens des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors oder anderer adäquater primärer Rezeptoren nicht empfänglich für Ad-Infektionen sind (Einfeld et al., 2001).

Für die Umsetzung des adenoviralen Retargeting existieren im Wesentlichen zwei unterschiedliche Strategien, das genetische sowie das nicht-genetische Retargeting. Beide zielen darauf ab, den natürlichen Tropismus der Adenoviren zu modifizieren, um ausschließlich bestimmte Zielzellen oder -gewebe spezifisch und effizient zu infizieren.

Strategien des genetischen Retargeting beinhalten die Konstruktion chimärer Fiberproteine (Krasnykh et al., 1996) bzw. Modifikationen im Sinne des Einbringens von Erkennungssequenzen zellulärer Rezeptoren in Pentonbasis (Wickham et al., 1995), Hexon (Vigne et al., 1999) oder Fiberknopf (Krasnykh et al., 1997, 2001; Dmitriev et al., 1998; Kirby et al., 1999; Wesseling et al., 2001; Martin et al., 2003; Nagel et al., 2003). Besondere Bedeutung hat diesbezüglich insbesondere die an  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine bindenden RGD-Sequenz, wobei aber auch alternative Peptidliganden in Frage kommen. Ein chimäres Pentonbasis-Protein, in dem das RGD-Motiv durch das Triplet LDV ersetzt wurde, zeigte sich in der Lage, an das Integrin  $\alpha_4\beta_1$  zu binden, welches in großem Umfang auf Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird (Wickham et al., 1995).

Die Entwicklung von Adenovirus-Vektoren, in denen die Fiber oder die Pentonbasis entsprechend den speziellen Rezeptoren und Integrinen der Zielzelle verändert bzw. angepasst sind, z. B. passende Integrin-Erkennungsstellen tragen, könnte so einen effizienteren, gewebsspezifischen Gen-Transfer ermöglichen (Wickham et al., 1996; 1997; Koizumi et al., 2003). Ad 5-basierte Vektoren, in deren Fiberknopf eine RGD-Domäne eingefügt wurde, zeigten in verschiedenen Zell- und Gewebetypen eine deutlich höhere Transduktionseffizienz als solche, denen dieses Triplet fehlte (Biermann et al., 2001; Gao et al., 2004).

In diesem Zusammenhang bemerkenswert ist, daß das die RGD-Sequenz erkennende Integrin  $\alpha_v\beta_3$  von den Endothelzellen der Blutgefäße in großem

Umfang, und auch in verschiedenen neoplastischen Geweben in erhöhtem Maß exprimiert wird (Max et al., 1997; McDonald et al., 1999; Bauerschmitz et al., 2004). Auf diese Weise könnte die Angiogenese, die eine Schlüsselrolle z. B. bei der Wundheilung, aber auch beim Wachstum und der Metastasierung maligner Tumoren spielt, der selektiven Gentherapie zugänglich gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden bereits auf retroviralen Hüllproteinen basierende liposomale Vektoren, sogenannte AVP (artificial virus-like particles), entwickelt, die mit einer das Tripeptid RGD enthaltenden Polypeptidsequenz versehen wurden, welche als Ligand für die auf den Endothelzellen der Tumorgefäße verstärkt exprimierten  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine diente (Muller et al., 2001; Nahde et al., 2001).

Auch mit adenoviralen Vektoren mit RGD-modifizierten Fibern, die einen Apoptose-induzierenden Liganden enthalten, konnten bereits in vivo Regressionen im Wachstum von Pankreas- und Darmtumoren erzielt werden (Jacob et al., 2004).

Auf ähnliche Weise konnte mit an Zytostatika gekoppelten Phagenpeptiden, welche die RGD-Sequenz enthielten, die Effizienz des Chemotherapeutikums gegen humane Brustkrebs-Xenografte in Mäusen gesteigert, und durch die selektive Bindung gleichzeitig seine Toxizität reduziert werden (Arap et al., 1998). Auch andere nicht-virale Gentransportersysteme, bestehend aus Protein-Plasmid-DNA-Komplexen, erzielten bereits unter Verwendung von RGD-Tripeptiden eine erfolgreiche Genexpression in Tumorzellen (Hosseinkhani und Tabata, 2004). Ein alternativer Weg wurde mit der Einführung der gesamten Pentonbasis-Sequenz oder ihrer zentralen Region in Lambda-Phagen besprochen, auch diese chimären Vektoren erwiesen sich als effizient in der Transduktion von Säugetierzellen (Piersanti et al., 2004).

Einen weiteren Ansatzpunkt der Gentherapie stellen die dendritischen Zellen dar, die als am effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen, und somit als Initiatoren der T-Zell-Antwort gegen mikrobiologische Pathogene und maligne Tumoren, eine entscheidende Position im Immunsystem einnehmen. Die Immunisierung mittels Vektor-vermittelten Transfers von Tumor-assoziiertem



Antigenmaterial in diese Zellen könnte eine Art von Anti-Tumor-Immunität induzieren. Dendritische Zellen exprimieren allerdings nur geringe Mengen des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors, eine ausreichende Expression von  $\alpha_v$ -Integrinen konnte jedoch nachgewiesen werden. Durch den Einsatz Ad-basierter Vektoren mit Insertion eines RGD-Tripeptids in den HI-Loop des Fiberknopfes konnten so bereits dendritische Zellen in vitro effizient transduziert werden (Asada-Mikami et al., 2001; Okada et al., 2001). Darüber hinaus gelang es bereits, durch derart modifizierte Vektoren, die ein Oberflächenantigen eines malignen Tumors kodierten, in Mäusen eine signifikant erhöhte zelluläre Immunität gegen dieses Antigen zu erzeugen, resultierend in regredientem Tumorwachstum (Worgall et al., 2003).

Auch zur Verhinderung der Re-Stenosierung von Venenimplantaten nach koronaren Bypass-Operationen könnte die Gentherapie mit rekombinanten adenoviralen Vektoren ein vielversprechendes Werkzeug sein (Raman et al., 2004). Limitiert wird dieser experimentelle Ansatz erneut vor allem durch die niedrige Transduktionseffizienz der Muskel- und Endothelzellen der Blutgefäße, zurückzuführen auf die geringe Expression des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors in diesen Zellen. Auch auf diesem Anwendungsgebiet konnte durch Vektoren mit eingefügter RGD-Sequenz im HI-Loop des Fiberknopfes bereits ein erhöhter Gentransfer bzw. eine verstärkte Genexpression erzielt werden (Hay et al., 2001).

Viele dieser Strategien des genetischen Retargeting lassen jedoch native Bindungsstrukturen des Virions unverändert und erweitern somit lediglich den viralen Tropismus, statt ihn gezielt einzugrenzen. Damit diese Vektoren effektiv in vivo funktionieren, sind gewebespezifische Promotoren oder andere regulatorische Elemente notwendig, die native Zellbindungen unterdrücken. Dennoch werden trotz des erhaltenen Tropismus die virale Dissemination und somit auch die Toxizität reduziert, weil aufgrund der erhöhten Spezifität die Applikation geringerer Vektordosen möglich ist (Vigne et al., 1999).

Ein vollständiges genetisches Retargeting mit grundlegend verändertem Tropismus konnte unlängst erzielt werden, indem Wirtzell-bindende Liganden

des Ad-Fiberknopfes deletiert, und simultan mit dem Integrin-bindenden RGD-Motiv oder alternativen Sequenzen neue Bindungsliganden in den Knopf des Vektors eingebracht wurden (Magnusson et al., 2001; Gaden et al., 2004).

Einen alternativen Weg, die Spezifität der Transduktion zu erhöhen, stellt der Ansatz dar, die Expression entsprechender Rezeptoren auf den Zielzellen zu erhöhen, z.B. durch Aktivierung der Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -Expression von peripheren Lymphozyten durch Einsatz von Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) (Shuang et al., 1995).

Die Methode des nicht-genetischen Retargeting beinhaltet die Entwicklung von Retargeting-Komplexen oder Pseudorezeptoren, die im Sinne von bispezifischen Antikörpern simultan spezifische Kapsomere oder in Kapsomere des Virions eingebrachte Epitope und Oberflächenmoleküle der gewünschten Wirtszelle erkennen (Douglas et al., 1996; Rogers et al., 1997; Miller et al., 1998; Einfeld et al., 1999; v. Beusechem et al., 2002). Dmitriev et al. entwickelten ein bispezifisches Targeting-Protein, das aus der Ektodomäne des Coxsackie- und Adenovirusrezeptors in Fusion mit EGF (Human epidermal growth factor)-Molekülen besteht. Dieses rekombinante Fusionsprotein blockierte die native, Zell-bindende Domäne des Fiberknopfes und ermöglichte ein vom Coxsackie- und Adenovirusrezeptor unabhängiges Targeting des Vektors. Als Ligand wurde EGF ausgewählt, weil EGF-Rezeptoren auf einer Vielzahl von Tumorzellen in hoher Dichte exprimiert werden. Ein in der Effizienz deutlich gesteigerter Gentransfer in bestimmte Tumorzelltypen, die EGF in großem Umfang exprimieren, konnte so erzielt werden (Dmitriev et al., 2000). Einen ähnlichen Ansatz verfolgt die Verwendung bifunktionaler Polyethylenglycol-Moleküle, die mit der einen funktionellen Gruppe mit dem Kapsid des Adenovirus-Vektors konjugiert sind und die Interaktion zwischen Fiberknopf und Coxsackie- und Adenovirusrezeptor unterbinden, während die andere funktionelle Gruppe, in die ein RGD-Peptid eingefügt wurde, für ein erfolgreiches Retargeting an Endothelzellen sorgt (Ogawara et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit des nicht-genetischen Retargeting findet mittels Einsatz Tumor- oder Gewebespezifischer Promotoren auf der Ebene der Transkription statt, so daß die Replikation des Vektors und/oder die transgene Expression ausschließlich in Tumorzellen stattfinden kann (Doronin et al., 2001).

### **5.3.3 Strategien zur Reduktion der Immunogenität**

Gegenwärtig stellen auf Adenoviren basierende Vektorsysteme das effizienteste System für die in vivo-Transduktion dar. Allerdings ist die transgene Expression, resultierend aus der episomalen Natur der gelieferten DNA und aufgrund der trotz multi-defektiver, multipel deletierter Vektoren durch die in den transduzierten Zellen synthetisierten viralen Proteine induzierten Immunantwort, nur relativ kurzlebig.

Unlängst wurde eine neue Klasse von Ad-Vektoren entwickelt, in denen die meisten viralen Gene deletiert sind. Diese Vektoren weisen lediglich noch die für Replikation und Verpackung erforderlichen DNA-Elemente auf. Diese sogenannten »Gutless«-Vektoren benötigen die Anwesenheit eines rekombinanten Helfer-Ad, das die notwendigen Funktionen bezüglich Genomreplikation und Verpackung zur Verfügung stellt. Als Folge des Entfernens der meisten viralen Genomsequenzen bieten diese Vektoren viel Platz für große Fragmente von Fremd-DNA und sind deutlich weniger immunogen als herkömmliche adenovirale Vektoren. Allerdings ändert dieser Fortschritt nichts an dem episomalen Status der transferierten DNA, der im Verlust des therapeutischen Gens nach der Teilung der Zielzelle resultiert (Goncalves et al., 2001).

Eine andere Strategie zur Reduktion der Immunantwort nach Applikation adenoviraler Vektoren, insbesondere bei erforderlicher wiederholter Anwendung, stellt die Immunmodulation durch Gabe immunsuppressiver Medikation dar, durch die eine prolongierte transgene Expression erreicht werden konnte (Gahery-Segard, 1997). Ebenso vorstellbar wäre die mit der Vektorapplikation simultane Verabreichung synthetischer, die noch im Detail zu identifizierenden immunogenen Epitope des Viruskapsids imitierender

Peptide, welche präexistente neutralisierende Antikörper des Wirtes blockieren könnten (Hong et al., 2003).

#### **5.4 Abschließende Betrachtung**

Zusammenfassend kann konstatiert werden, daß die Gentherapie zum heutigen Zeitpunkt, trotz vieler Rückschläge und noch zu überwindender Schwierigkeiten, einen vielversprechenden Therapieansatz für unterschiedlichste Krankheitsbilder darstellt. Insbesondere auf onkologischem Gebiet skizzieren aktuelle Studien vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.

Neben den Retroviren gelten die Adenoviren aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften als eines der am besten geeigneten Vektorsysteme. Der Schlüssel zum effizienteren Gentransfer liegt eindeutig im Retargeting. Selektiv an Zielzellen bzw. -gewebe andockende, weniger immunogene Vektoren werden gegenwärtig entwickelt und verbessert.

Ein Großteil der aktuellen Studien berücksichtigt diesbezüglich die Interaktionen zwischen dem RGD-Tripeptid oder anderen Integrin-Erkennungssequenzen und den auf den verschiedenen Zell- und Gewebetypen exprimierten Rezeptoren.

Die vorliegende Studie konnte belegen, daß auch der Adenovirus-Serotyp 8 über die RGD-Sequenz seines Pentonbasis-Proteins mit Zellen zu interagieren vermag, daß aber auch alternative Domänen diese Funktion erfüllen können. Weiterführende Studien sind erforderlich, um andere Erkennungssequenzen zu identifizieren, nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip spezifisch und effizient an gewünschte Zellen andockende Vektoren zu entwickeln und somit die enormen Möglichkeiten des therapeutischen Gentransfers klinisch nutzbar zu machen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das ikosaedrische Kapsid der Adenoviren besteht aus 252 Kapsomeren. 240 Hexone bilden die Flächen, während die Pentonbasen an den Ecken lokalisiert sind, an ihnen inserieren die Fibern.

Neben der Vermittlung der Internalisierung des Virus an die Wirtszelle durch Bindung an  $\alpha_v$ -Integrine zeigt das adenovirale Pentonbasis-Protein auch isoliert in vitro zellabrundende Aktivität. Dieser frühe cytopathische Effekt (CPE) tritt bereits einige Stunden nach der Infektion auf.

Für die Pentonbasis von Ad2 konnte bereits demonstriert werden, daß eine RGD-Sequenz in einer hypervariablen, zentralen Region, die von konservierten Bereichen flankiert wird, diese Zellabrundungen induziert. Um zu eruieren, ob die Pentonbasis-Proteine von Subgenus C- und Subgenus D-Adenoviren gemeinsame Eigenschaften aufweisen, wurde zunächst die Pentonbasis des Serotyps 8 (Subgenus D I) sequenziert. Die nachfolgende Analyse der Aminosäure-Sequenzen der beiden Serotypen ergab, daß die Gesamtorganisation der Ad8-Pentonbasis, einschließlich der RGD-Sequenz in der hypervariablen Region, weitgehende Übereinstimmung mit der Pentonbasis von Ad2 aufweist. Die Gegenüberstellung anderer verfügbarer Pentonbasis-Sequenzen enthüllte mehrere konservierte Domänen mit möglicher Auswirkung auf die CPE-Aktivität.

Insgesamt 28 verkürzte, deletierte oder punktmutierte Ad8-Pentonbasis-Proteine wurden konstruiert, in *E. coli* exprimiert und anschließend mit HeLa-Zellkulturen inkubiert. Ein früher CPE bzw. dessen Ausbleiben wurde lichtmikroskopisch nachgewiesen.

Es konnte bestätigt werden, daß die Variation der RGD-Sequenz grundsätzlich in einem Verlust der zellabrundenden Aktivität der Pentonbasis resultiert. Die Modifikation von drei außerhalb der hypervariablen Region gelegenen Domänen hatte den selben Effekt, darauf hinweisend, daß diese Bereiche essentiell für die Sekundärstruktur des Proteins sind.

Das RGD-Tripeptid ist die Erkennungssequenz für die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$ . Um herauszufinden, ob die Bindung an andere als diese Integrine ebenfalls

einen frühen CPE auszulösen vermag, wurden zwei Pentonbasis-Proteine konstruiert, in denen die RGD-Domäne durch Sequenzen ersetzt wurde, die von  $\alpha_1\beta_1$ -,  $\alpha_3\beta_1$ - und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrinen erkannt werden. Beide rekombinanten Proteine induzierten einen frühen CPE, was belegt, daß diese beiden Proteine ebenfalls in der Lage waren, an korrespondierende zelluläre Integrine zu binden, die Pentonbasis von Ad8 also auch mit anderen als den bisher zumeist beschriebenen  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen interagieren kann.

Auf Adenoviren basierende Vektoren zählen gegenwärtig zu den vielversprechendsten Transfersystemen der Gentherapie. Der breite Wirtzelltropismus der Adenoviren ist diesbezüglich sowohl ein Vorteil als auch ein entscheidender Nachteil. Die Ergebnisse dieser Studie könnten zur Entwicklung effizienterer, Gewebe-spezifischer adenoviraler Vektoren beitragen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**Adrian, T., Wadell, G., Hierholzer, J.C., Wigand, R. (1986).**

DNA restriction analysis of adenovirus prototypes 1 to 41. *Arch. Virol.* 91, 277–290.

**Adrian, T., Wolf, U., Lauer, H.J., Wigand, R. (1990).**

Restriction site mapping of adenovirus type 8 genome types. *Res. Virol.* 141, 611–624.

**Akopian, T.A., Lazareva, S.E., Tikhomirov, E.E., Karpov, V.A., Naroditsky, B.S. (1996).**

Genes for fowl adenovirus CELO penton base and core polypeptides. *Arch. Virol.* 41, 357–365.

**Akusjärvi, G., Pettersson, U., Roberts, R.J. (1986).**

Structure and function of the adenovirus 2 genome.

In: Doerfler, W. (ed.). *Adenovirus DNA*. Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 53–95.

**Albinsson, B., Kidd, A.H. (1999).**

Adenovirus type 41 lacks an RGD  $\alpha_v$ -integrin binding motif on the penton base and undergoes delayed uptake in A 549 cells. *Virus Res.* 64, 125–136.

**Anders, K.H., Park, C.S., Cornford, M.E., Vinters, H.V. (1990).**

Adenovirus encephalitis and widespread ependymitis in a child with AIDS.

*Ped. Neurosur.* 16, 316–320

**Arap, W., Pasqualini, R., Ruoslahti, E. (1998).**

Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 279, 377–380.

**Arnberg, N., Edlund, K., Kidd, A.H., Wadell, G. (2000 a).**

Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J. Virol.* 74, 42–48.

**Arnberg, N., Kidd, A.H., Edlund, K., Olfat, F., Wadell, G. (2000 b).**

Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A 549 cellular receptors:

Sialic acid versus  $\alpha_v$  integrins.

*J. Virol.* 74, 7691–7693.

**Arnberg, N., Kidd, A.H., Edlund, K., Nilsson, J., Pring-Åkerblom, P., Wadell, G. (2002 a).**

Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction. *Virology* 302, 33–43.

**Arnberg, N., Pring-Åkerblom, P., Wadell, G. (2002 b).**

Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells.

*J. Virol.* 76, 8834–8841.

**Asada-Mikami, R., Heike, Y., Kanai, S., Azuma, M., Shirakawa, K., Takaue, Y.,**

**Krasnykh, V., Curriel, D.T., Terada, M., Abe, T., Wakasugi, H. (2001).**

Efficient gene transduction by RGD-fiber modified recombinant adenovirus into dendritic cells.

*Jpn. J. Cancer Res.* 92, 321–327.

**Athappilly, F.K., Murali, R., Rux, J.J., Cai, Z., Burnett, M. (1994).**

The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2,9 Å resolution.

*J. Mol. Biol.* 242, 430–455.

**Bai, M., Harfe, B., Freimuth, P. (1993).**

Mutations that alter an Arg-Gly-Asp(-RGD-) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells.

*J. Virol.* 67, 5198–5205.

**Bai, M., Campisi, L., Freimuth, P. (1994).**

Vitronectin receptor antibodies inhibit infection of HeLa and A 549 cells by adenovirus type 12 but not by adenovirus type 2.  
J. Virol. 68, 5925–5932.

**Bajanowski, T., Wiegand, P., Cecchi, R., Pring-Åkerblom, P., Adrian, T., Jorch, G., Brinkmann, B. (1996).**

Detection and significance of adenoviruses in cases of sudden infant death.  
Virchows Arch. 428, 113–118.

**Bauerschmitz, G.J., Kanerva, A., Wang, M., Herrmann, I., Shaw, D.R., Strong, T.V., Desmond, R., Rein, D.T., Dall, P., Curiel, D.T., Hemminki, A. (2004).**

Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer.  
Int. J. Cancer. 111, 303–309.

**Belin, M.-T., Boulanger, P. (1993).**

Involvement of cellular adhesion sequences in the attachment of adenovirus to the HeLa cell surface.  
J. Gen. Virol. 74, 1485–1497.

**Bell, J.A., Rowe, W.P., Engler, J.I., Parrott, R.H. (1955).**

Pharyngoconjunctival fever. Epidemiological studies of a recently recognized disease entity.  
J. Am. Med. Ass. 157, 1083–1092.

**Benihoud, K., Yeh, P., Perricaudet, M. (1999).**

Adenovirus vectors for gene delivery.  
Curr. Opin. Biotechnol. 10, 440–447.

**Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W. (1997).**

Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.  
Science 275, 1320–1323.

**Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A. (1977).**

Spliced segments at the 5'-terminus of adenovirus 2 late mRNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3171–3175.

**v. Beusechem, V.W., Grill, J., Mastenbroek, D.C.J., Wickham, T.J., Roelvink, P.W., Haisma, H.J., Lamfers, M.L.M., Dirven, C.M.F., Pinedo, H.M., Gerritsen, W.R. (2002).**

Efficient and selective gene transfer into primary human brain tumors by using single-chain antibody-targeted adenoviral vectors with native tropism abolished.  
J. Virol. 76, 2753–2762.

**Biermann, V., Volpers, C., Hussmann, S., Stock, A., Kewes, H., Schiedner, G., Herrmann, A., Kochanek, S. (2001).**

Targeting of high-capacity adenoviral vectors.  
Hum. Gene Ther. 12, 1757–1769.

**Block, A., Windler, E., Greten, H., Woo, S.L.C. (1997).**

Gentherapie bei Kolonkarzinom. Mit Viren gegen Metastasen.  
Dtsch. med. Wschr. 122, 728–732.

**Boudin, M.L., Moncany, M., D'Halluin, J.C., Boulanger, P. (1979).**

Isolation and characterization of adenovirus type 2 vertex capsomer (penton base).  
Virology 92, 125–138.

**Boudin, M.L., D'Halluin, J.C., Cousin, C., Boulanger, P. (1980).**

Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation.  
Virology 101, 144–156.



**Boudin, M.L., Boulanger, P. (1982).**

Assembly of adenovirus penton base and fiber.  
Virology 116, 589–604.

**Brandt, C.D., Kim, H.W., Vargosko, A.J., Jeffries, B.C., Arrobio, J.O., Rindge, B., Parrot, R.H., Channock, R.M. (1969).**

Infections in 18 000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease.  
Am. J. Epidemiol. 90, 484–500.

**Breyer, B., Jiang, W., Cheng, H., Zhou, L., Paul, R., Feng, T., He, T.C. (2001).**

Adenoviral vector-mediated gene transfer for human gene therapy.  
Curr. Gene Ther. 1, 149–162.

**Bui, L.A., Butterfield, L.H., Kim, J.Y., Ribas, A., Seu, P., Lau, R., Glaspy, J.A., McBride, W.H., Economou, J.S. (1997).**

In vivo therapy of hepatocellular carcinoma with a tumor-specific adenoviral vector expressing interleukin 2.  
Hum. Gene Ther. 8, 2173–2182.

**Chardonnet, Y., Dales, S. (1970).**

Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells.  
I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome.  
Virology 40, 462–477.

**Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., Mehtali, M. (1996).**

Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*.  
J. Virol. 70, 4805–4810.

**Chiu, C.Y., Mathias, P., Nemerow, G.R., Stewart, P.L. (1999).**

Structure of adenovirus complexes with its internalization receptor,  $\alpha_v\beta_5$  integrin.  
J. Virol. 73, 6759–6768.

**Chow, L.T., Broker, T.R. (1978).**

The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late mRNAs.  
Cell 15, 497–510.

**Chroboczek, J., Gout, E., Favier, A.L., Galinier, R. (2003).**

Novel partner proteins of adenovirus penton.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 272, 37–55.

**Cichon, G., Boeckh-Herwig, S., Schmidt, H.H., Wehnes, E., Muller, T., Pring-Åkerblom, P., Burger, R. (2001).**

Complement activation by recombinant adenoviruses.  
Gene Ther. 8, 1794–1800.

**Copie, V., Tomita, Y., Akiyama, S.K., Aota, S., Yamada, K.M., Venable, R.M., Pastor, R.W., Krueger, S., Torchia, D.A. (1998).**

Solution structure and dynamics of linked cell attachment modules of mouse fibronectin containing the RGD and synergy regions: Comparison with the human fibronectin crystal structure.  
J. Mol. Biol. 277, 663–682.

**Croyle, M.A., Chirmule, N., Zhang, Y., Wilson, J.M. (2001).**

»Stealth« adenoviruses blunt cell-mediated and humoral immune response against virus and allow for significant gene expression upon readministration in the lung.  
J. Virol. 75, 4792–4801.

**Cuzange, A., Chroboczek, J., Jacrot, B. (1994).**

The penton base of human adenovirus type 3 has the RGD-motif.  
Gene 146, 257–259.

- Davison, A.J., Telford, E.A., Watson, M.S., McBride, K., Mautner, V. (1993).**  
The DNA sequence of adenovirus type 40.  
*J. Mol. Biol.* 234, 1308–1316.
- Defer, C., Belin, M.-T., Caillet-Boudin, M.-L., Boulanger, P. (1990).**  
Human adenovirus-host cell interactions: Comparative study with members of subgroups B and C.  
*J. Virol.* 64, 3661–3673.
- De Jong, J.C., Wermenbol, A.G., Verweij-Uijterwaal, M.W., Slaterus, K.W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G.J.J., Khoo, S.H., Hierholzer, J.C. (1999).**  
Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad 50 and Ad 51 of species B1 and D, respectively.  
*J. Clin. Microbiol.* 37, 3940–3945.
- Diamond, M., Springer, T.A. (1994).**  
The dynamic regulation of integrin adhesiveness.  
*Curr. Biol.* 4, 506–517.
- Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C.R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Beloudsova, N., Curiel, D.T. (1998).**  
An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism.  
*J. Virol.* 72, 9706–9713.
- Dmitriev, I., Kashentseva, E., Rogers, B.E., Krasnykh, V., Curiel, D.T. (2000).**  
Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells.  
*J. Virol.* 74, 6875–6884.
- Doerfler, W. (1969).**  
Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK 21) with adenovirus type 12.  
*Virology* 38, 587–606.
- Doronin, K., Kuppaswamy, M., Toth, K., Tollefson, A.E., Krajcsi, P., Krougliak, V., Wold, W.S.M. (2001).**  
Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy.  
*J. Virol.* 75, 3314–3324.
- Douglas, J.T., Rogers, B.E., Rosenfeld, M.E., Michael, S.I., Feng, M., Curiel, D.T. (1996).**  
Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors.  
*Nat. Biotechnol.* 14, 1574–1578.
- Einfeld, D.A., Brough, D.E., Roelvink, P.W., Kovesdi, I., Wickham, T.J. (1999).**  
Construction of a pseudoreceptor that mediates transduction by adenoviruses expressing a ligand in fiber or penton base.  
*J. Virol.* 73, 9130–9136.
- Einfeld, D.A., Schroeder, R., Roelvink, P.W., Lizonova, A., Richter King, C., Kovesdi, I., Wickham, T.J. (2001).**  
Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions.  
*J. Virol.* 75, 11284–11291.
- Eiz, B., Pring-Åkerblom, P. (1997).**  
Molecular characterization of the type-specific  $\gamma$ -determinant located on the adenovirus fiber.  
*J. Virol.* 71, 6576–6581.

**Enders, J.F., Dingle, J.H., Francis, J., Hilleman, M.R., Huebner, R.J., Payne, A.M.M. (1956).**  
Adenovirus: group name proposed for a new respiratory tract virus.  
*Science* 124, 119–120.

**Everett, S.F., Ginsberg, H.S. (1958).**  
A toxin-like material separable from type 5 adenovirus particles.  
*Virology* 6, 770–771.

**Everitt, E., Sundquist, B., Pettersson, U., Philipson, L. (1973).**  
Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2.  
*Virology* 52, 130–147.

**Fox, J.P., Hall, C.E., Cooney, M. (1977).**  
The Seattle virus watch. VII: Observation of adenovirus infections.  
*Am. J. Epidemiol.* 105, 362–386.

**Gaden, F., Franqueville, L., Magnusson, M.K., Hong, S.S., Merten, M.D., Lindholm, L., Boulanger, P. (2004).**  
Gene transduction and cell entry pathway of fiber-modified adenovirus type 5 vectors carrying novel endocytic peptide ligands selected on human tracheal glandular cells.  
*J. Virol.* 78, 7227–7247.

**Gahery-Segard, H., Farace, F., Godfrin, D., Gaston, J., Lengagne, R., Tursz, T., Boulanger, P., Guillet, J.-G. (1998).**  
Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: Anti-fiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity.  
*J. Virol.* 72, 2388–2397.

**Gao, G.-P., Yang, Y., Wilson, J.M. (1996).**  
Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy.  
*J. Virol.* 70, 8934–8943.

**Gao, J.Q., Alexandre, L.S., Tsuda, Y., Katayama, K., Eto, Y., Sekiguchi, F., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakayama, T., Yoshie, O., Tsutsumi, Y., Mayumi, T., Nakagawa, S. (2004).**  
Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors.  
*Pharmazie* 59, 238–239.

**Gelfand, M.S., Cleveland, K.O., Lancaster, D., Corbett, C.E., Florendo, N.T. (1994).**  
Adenovirus parotitis in patients with AIDS.  
*Clin. Infect. Dis.* 19, 1045–1048.

**Gingeras, T.R., Sciaky, D., Gelinas, R.E., Bing-Dong, J., Yen, C.E., Kelly, M.M., Bullock, P.A., Parson, B.L., O'Neill, K.E., Roberts, R.J. (1982).**  
Nucleotide sequences from the adenovirus 2 genome.  
*J. Biol. Chem.* 257, 13475–13491.

**Ginsberg, H.S. (1984).**  
The adenoviruses.  
Plenum Press, New York.

**Ginsberg, H.S., Pereira, H.G., Valentine, R.C., Wilcox, W.C. (1966).**  
A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits.  
*Virology* 28, 782–783.

**Goldman, M.J., Wilson, J.M. (1995).**  
Expression of  $\alpha_v\beta_5$  integrin is necessary for efficient adenovirus-mediated gene transfer in the human airway.  
*J. Virol.* 69, 5951–5958.

- Goncalves, M.A.F.V., Pau, M.G., de Vries, A.A.F., Valerio, D. (2001).**  
Generation of a high-capacity hybrid vector: Packaging of recombinant adenoassociated virus replicative intermediates in adenovirus capsids overcomes the limited cloning capacity of adenoassociated virus vectors.  
*Virology* 288, 236–246.
- Goodman, J., Trask, T., Chen, S.-H., Woo, S., Grossman, R., Carey, K., Hubbard, G., Carrier, D., Rajagopalan, S., Aguilar-Cordova, E., Shine, H. (1996).**  
Adenoviral-mediated thymidine kinase gene transfer into the primate brain followed by systemic ganciclovir: pathologic, radiologic, and molecular studies.  
*Hum. Gen. Ther.* 7, 1241–1250.
- Green, W.R., Greaves, W.L., Frederick, W.L., Tadesse-Heath, L. (1994).**  
Renal infection due to adenovirus in a patient with HIV-infection.  
*Clin. Inf. Dis.* 18, 989–991.
- Grumbach, I.M., Heim, A., Pring-Åkerblom, P., Kreuzer, H., Figulla, H.R. (1996).**  
Adenovirusgenom des Subgenus C im Myokard von erwachsenen Patienten mit Myokarditis.  
62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, *Z. Kardiol.* 85, Suppl. 2, 37.
- Guyer, B., O'Day, D.M., Hierholzer, J.C., Schaffner, W. (1975).**  
Epidemic keratoconjunctivitis: A common outbreak of mixed adenovirus type 8 and type 19 infection.  
*J. Infect. Dis.* 132, 142–150.
- Harrach, B., Meehan, B.M., Benkö, M., Adair, B.M., Todd, D. (1997).**  
Close phylogenetic relationship between egg drop syndrome virus, bovine adenovirus serotype 7 and ovine adenovirus strain 287.  
*Virology* 229, 302–308.
- Harvey, B.G., Hackett, N.R., El-Sawy, T., Rosengart, T.K., Hirschowitz, E.A., Lieberman, M.D., Lesser, M.L., Crystal, R.G. (1999).**  
Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs.  
*J. Virol.* 73, 6729–6742.
- Havenga, M.J.E., Lemckert, A.A.C., Grimbergen, J.M., Vogels, R., Huisman, L.G.M., Valerio, D., Bout, A., Quax, P.H.A. (2001).**  
Improved adenovirus vectors for infection of cardiovascular tissues.  
*J. Virol.* 75, 3335–3342.
- Hay, C.M., De Leon, H., Jafari, J.D., Jakubczak, J.L., Mech, C.A., Hallenbeck, P.L., Powell, S.K., Liao, G., Stenvenson, S.C. (2001).**  
Enhanced gene transfer to rabbit jugular veins by an adenovirus containing a cyclic RGD motif in the HI loop of the fiber knob.  
*J. Vasc. Res.* 38, 315–323.
- Henry, L.J., Xia, D., Wilke, M.E., Deisenhofer, J., Gerard, R.D. (1994).**  
Characterization of the knob domain of the adenovirus type 5 fiber protein expressed in *Escherichia coli*.  
*J. Virol.* 68, 5239–5246.
- Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P.L., Bergelson, J.M., Hackett, N.R., Finberg, R.W., Wickham, T.J., Kovesdi, I., Roelvink, P., Crystal, R.G. (1999).**  
CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts.  
*J. Clin. Invest.* 103, 579–587.

**Hilleman, M.R., Werner, J.H. (1954).**

Recovery of a new agent from patents with acute respiratory illness.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 183–188.

**Hodges, B.L., Evans, H.K., Everett, R.S., Ding, E.Y., Serra, D., Amalfitano, A. (2001).**

Adenovirus vectors with the 100K gene deleted and their potential for multiple gene therapy applications.  
J. Virol. 75, 5913–5920.

**Hong, S.S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D.T., Boulanger, P.A. (1997).**

Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I  $\alpha 2$  domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells.  
EMBO J. 16, 2294–2306.

**Hong, S.S., Habib, N.A., Franqueville, L., Jensen, S., Boulanger, P.A. (2003).**

Identification of Adenovirus (Ad) penton base neutralizing epitopes by use of sera from patients who had received conditionally replicative Ad (Ad dl1520) for treatment of liver tumors.  
J. Virol. 77, 10366–10375.

**Horne, R.W., Brenner, S., Waterson, A.P., Wildy, P. (1959).**

The icosahedral form of an adenovirus.  
J. Mol. Biol. 1, 84–86.

**Horoupian, D.S., Pick, P., Spigland, I. (1984).**

AIDS and multiple tract degeneration in a homosexual man.  
Ann. Neurol. 15, 502–505.

**Horwitz, A.F. (1997).**

Integrins and health.  
Sci. Am. 276, 68–75.

**Horwitz, M.S., Scharff, M.D., Maizel, J.V. (1969).**

Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly and morphogenesis of the virion.  
Virology 39, 682–694.

**Horwitz, M.S. (1985).**

Adenoviral diseases.  
Virology, edited by B.N. Fields et al.. Raven Press, New York.

**Horwitz, M.S. (1990).**

Adenoviridae and their replication.  
In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Channock, R.M., Hirsch, M.S., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B. (eds.), Virology. Raven, New York, 1679–1721.

**Hosseinkhani, H., Tabata, Y. (2004).**

PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences, Pronectin (R).  
J. Control Release 31, 157–171.

**Huang, S., Endo, R.I., Nemerow, G.R. (1995).**

Upregulation of integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery.  
J. Virol. 69, 2257–2263.

**Huang, S., Kamata, T., Takada, Y., Ruggeri, Z.M., Nemerow, G.R. (1996).**

Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells.  
J. Virol. 70, 4502–4508.

**Huebner, R.J., Rowe, W.P., Ward, T.G., Parrott, R.H., Bell, J.A. (1954).**

Adenoidal pharyngeal conjunctival agents.  
New Engl. Med. 251, 1077–1086.

**Huebner, R.J. (1967).**

Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5.  
J. Virol. 17, 924–934.

**Hynes, R.O. (1992).**

Integrins. Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.  
Cell 69, 11–25.

**Ibelgaufts, H. (1990).**

Gentechnologie von A bis Z.  
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

**Jacob, D., Davis, J., Zhu, H., Zhang, L., Teraishi, F., Wu, S., Marini, F.C.3rd, Fang, B. (2004).**

Suppressing orthotopic pancreatic tumor growth with a fiber-modified adenovector expressing the TRAIL gene from the human telomerase reverse transcriptase promoter.  
Clin. Cancer Res. 10, 3535–3541.

**Jawetz, E., Kimura, S., Nicholas, A.M., Thygeson, P., Hanna, L. (1955).**

New type of APC virus from epidemic keratoconjunctivitis.  
Science 122, 1190.

**Karayan, L., Gay, B., Gerfaux, J., Boulanger, P.A. (1994).**

Oligomerization of recombinant penton base of adenovirus type 2 and its assembly with fiber in baculovirus-infected cells.  
Virology 202, 782–796.

**Karayan, L., Hong, S.S., Gay, B., Tournier, J., D'Angeac, A.D., Boulanger, P. (1997).**

Structural and functional determinants in adenovirus type 2 penton base recombinant.  
J. Virol. 71, 8678–8689.

**Kaus, M. (2004).**

Vergleichende Sequenzanalysen, Mutationen und Expression von Genen der Pentonbasis verschiedener Adenovirus-Primestämme des Subgenus D.  
Diss., Med. Hochschule Hannover.

**Khoo, S.H., Bailey, A.S., de Jong, J.C., Mandal, B.K. (1995).**

Adenovirus infections in HIV-positive patients: clinical features and molecular epidemiology.  
J. Inf. Dis. 172, 629–637.

**Kirby, I., Davison, E., Beavil, A.J., Soh, C.P.C., Wickham, T.J., Roelvink, P.W.,****Kovesdi, I., Sutton, B.J., Santis, G. (2000).**

Identification of contact residues and definition of the CAR-binding site of adenovirus type 5 fiber protein.  
J. Virol. 74, 2804–2813.

**Koizumi, N., Mizuguchi, H., Sakurai, F., Yamaguchi, T., Watanabe, Y., Hayakawa, T. (2003).**

Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and  $\alpha_v$ -integrin-binding ablation.  
J. Virol. 77, 13062–13072.

**Krasnykh, V.N., Mikheeva, G.V., Douglas, J.T., Curiel, D.T. (1996).**

Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism.  
J. Virol. 70, 6839–6846.

**Krasnykh, V.N., Dmitriev, I., Mikheeva, G., Miller, C.R., Belousova, N., Curiel, D.T. (1997).**  
Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the H I loop on the fiber knob.  
J. Virol. 72, 1844–1852.

**Krasnykh, V.N., Belousova, N., Korokhov, N., Mikheeva, G., Curiel, D.T. (2001).**  
Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T 4 fibrin.  
J. Virol. 75, 4176–4183.

**Krilov, L.R., Kaplan, M.H., Frogel, M. (1990).**  
Disseminated adenovirus infection with hepatic necrosis in a patient with HIV-infection and other immunodeficiency states.  
Rev. Inf. Dis. 13, 303–307.

**Laemmli, U.K. (1970).**  
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T 4.  
Nature 227, 121–129.

**Ljungman, P., Gleaves, C.A., Meyers, J.D. (1989).**  
Respiratory virus infection in immunocompromised patients.  
Bone Marrow Transplant. 4, 35–40.

**Louis, N., Fender, P., Barge, A., Kitts, P., Chroboczek, J. (1994).**  
Cell-binding domain of adenovirus serotype 2 fiber.  
J. Virol. 68, 4104–4106.

**Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A., Mehtali, M. (1997).**  
In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted.  
J. Virol. 72, 2022–2032.

**Magnusson, M.K., Hong, S.S., Boulanger, P., Lindholm, L. (2001).**  
Genetic retargeting of adenovirus: Novel strategy employing »deknobbing« of the fiber.  
J. Virol. 75, 7280–7289.

**Main, A.L., Harvey, T.S., Baron, M., Boyd, J., Campbell, I.D. (1992).**  
The three-dimensional structure of the tenth type III molecule of fibronectin: An insight into RGD-mediated interactions.  
Cell 71, 671–678.

**Martin, A.B., Webber, S., Fricker, F.J., Jaffe, R., Demmler, G., Kearney, D., Zhang, Y.-H., Bodurtha, J., Gelb, B., Ni, J., Bricker, J.T., Towbin, J.A. (1994).**  
Acute Myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children.  
Circulation 90, 330–339.

**Martin, K., Brie, A., Saulnier, P., Perricaudet, M., Yeh, P., Vigne, E. (2003).**  
Simultaneous CAR- and  $\alpha_v$  integrin binding ablation fails to reduce Ad 5 liver tropism.  
Mol. Ther. 8, 485–494.

**Mastrangeli, A., Harvey, B.G., Yao, J., Wolff, G., Kovetski, I., Crystal, R.G., Falck-Pedersen, E. (1996).**  
»Sero-switch« adenovirus-mediated in vivo gene transfer: Circumvention of anti-adenovirus humoral immune defenses against repeat adenovirus vector administration by changing the adenovirus serotype.  
Hum. Gene Ther. 7, 79–87.

**Mathias, P., Wickham, T., Moore, M., Nemerow, G. (1994).**  
Multiple adenovirus serotypes use  $\alpha_v$  integrins for infection.  
J. Virol. 68, 6811–6814.

**Mathias, P., Galleno, M., Nemerow, G. (1998).**

Interactions of soluble recombinant integrin  $\alpha_v\beta_5$  with human adenoviruses.  
J. Virol. 72, 8669–8675.

**Max, R., Gerritsen, R.R.C.M., Noouen, P.T.G.A., Goodman, S.L., Sutter, A., Keilholz, U., Rutter, D.J., De Waal, R.M.W. (1997).**

Immunohistochemical analysis of integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression on tumor-associated vessels of human carcinomas.  
Int. J. Cancer 71, 320–324.

**McCoy, R.J., Johnson, M.A., Studdert, M.J., Sheppard, M. (1996).**

Genomic location and nucleotide sequence of a porcine adenovirus penton base gene.  
Arch. Virol. 141, 1367–1375.

**McDonald, G.A., Zhu, G., Li, Y., Kovesdi, I., Wickham, T.J., Sukhatme, V.P. (1999).**

Efficient adenoviral gene transfer to kidney cortical vasculature utilizing a fiber modified vector.  
J. Gene Med. 1, 103–110.

**Miller, C.R., Buchsbaum, D.J., Reynolds, P.N., Douglas, J.T., Gillespie, G.Y., Mayo, M.S., Raben, D., Curiel, D.T. (1998).**

Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: Targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer.  
Cancer Res. 58, 5738–5748.

**Muller, K., Nahde, T., Fahr, A., Muller, R., Brusselbach, S. (2001).**

Highly efficient transduction of endothelial cells by targeted artificial virus-like particles.  
Cancer Gene Ther. 8, 107–117.

**Nagel, H., Maag, S., Tassis, A., Nestle, F.O., Greber, U.F., Hemmi, S. (2003).**

The  $\alpha_v\beta_5$  integrin of hematopoietic and nonhematopoietic cells is a transduction receptor of RGD-4C fiber modified adenoviruses.  
Gene Ther. 10, 1643–1653.

**Nahde, T., Muller, K., Fahr, A., Muller, R., Brusselbach, S. (2001).**

Combined transductional and transcriptional targeting of melanoma cells by artificial virus-like particles.  
J. Gene Med. 3, 353–361.

**Nermut, M.V. (1984).**

The architecture of adenoviruses.  
In: Ginsberg, H.S. (ed.), The adenoviruses. Plenum Press, New York, 5–34.

**Neumann, R., Chroboczek, J., Jacrot, B. (1988).**

Determination of the nucleotide sequence for the penton base gene of human adenovirus type 5.  
Gene 69, 153–157.

**Norrby, E. (1969).**

The structural and functional diversity of adenovirus capsid components.  
J. Gen. Virol. 5, 221–236.

**Norrby, E., Bartha, A., Boulanger, P., Dreizin, R.S., Ginsberg, H.S., Kalter, S.S., Kawamura, H., Rowe, W.P., Russel, W.C., Schlesinger, R.W., Wigand, R. (1976).**

Adenoviridae.  
Intervirology. 7, 117–125.



**Ogawara, K., Rots, M.G., Kok, R.J., Moorlag, H.E., van Loenen, A.M., Meijer, D.K., Haisma, H.J., Molema, G. (2004).**

A novel strategy to modify adenovirus tropism and enhance transgene delivery to activated vascular endothelial cells in vitro and in vivo.  
Hum. Gene Ther. 15, 433–443.

**Okada, N., Saito, T., Masunaga, Y., Tsukada, Y., Nakagawa, S., Mizuguchi, H., Mori, K., Okada, Y., Fujita, T., Hayakawa, T., Mayumi, T., Yamamoto, A. (2001).**

Efficient antigen gene transduction using arg-gly-asp fiber mutant adenovirus vectors can potentiate antitumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells.  
Cancer Res. 61, 7913–7919.

**Otake, K., Ennist, D.L., Harrod, K., Trapnell, B.C. (1998).**

Nonspecific inflammation inhibits adenovirus-mediated pulmonary gene transfer and expression independent of specific acquired immune responses.  
Hum. Gene Ther. 9, 2207–2222.

**Pereira, H.G. (1958).**

A protein factor responsible for early cytopathic effect of adenoviruses.  
Virology 6, 601–611.

**Pettersson, U., Hoeglund, S. (1969).**

Structural proteins of adenovirus. III. Purification and characterization of the adenovirus type 2 penton antigen.  
Virology 39, 90–106.

**Pickles, R.J., McCarthy, D., Matsui, H., Hart, P.J., Randell, S.H., Boucher, R.C. (1998).**

Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer.  
J. Virol. 72, 6014–6023.

**Piersanti, S., Cherubini, G., Martina, Y., Salone, B., Avitable, D., Grosso, F., Cundari, E., Di Zenzo, G., Saggio, I. (2004).**

Mammalian cell transduction and internalization properties of lambda phages displaying the full-length adenoviral penton base or its central domain.  
J. Mol. Med. (E-pub ahead of print).

**Pina, M., Green, M. (1956).**

Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 547–551.

**Pring-Åkerblom, P., Adrian, T. (1995).**

Characterization of adenovirus subgenus D fiber genes.  
Virology 206, 564–571.

**Pring-Åkerblom, P., Heim, A., Trijssenaar, F.E.J. (1996).**

Conserved sequences in the fibers of epidemic keratoconjunctivitis associated human adenoviruses.  
Arch. Virol. 142, 205–211.

**Pring-Åkerblom, P., Adrian, T., Köstler, T. (1997).**

Polymerase chain reaction based detection and typing of human adenoviruses in clinical samples.  
Res. Virol. 148, 225–231.

**Pring-Åkerblom, P., Heim, A., Trijssenaar, F.E.J. (1998).**

Molecular characterization of hemagglutination domains on the fibers of subgenus D adenoviruses.  
J. Virol. 72, 2297–2304.

- Pring-Åkerblom, P., Trijssenaar, F.E.J., Adrian, T., Hoyer, H. (1999).**  
Multiplex polymerase chain reaction for subgenus-specific detection of human adenoviruses in clinical samples.  
*J. Med. Virol.* 58, 87–92.
- Raman, K.G., Shapiro, R.A., Tzeng, E., Kibbe, M.R. (2004).**  
Adenovirus-mediated nitric oxide synthase gene transfer.  
*Methods Mol. Biol.* 279, 225–234.
- Ritter, T., Lehmann, M., Volk, H.D. (2002).**  
Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors.  
*BioDrugs* 16, 3–10.
- Roberts, R.J., O'Neill, K.E., Yen, C.T. (1984).**  
DNA sequence from the adenovirus 2 genome.  
*J. Biol. Chem.* 259, 13968–13975.
- Roelvink, P.W., Kovesdi, I., Wickham, T.J. (1996).**  
Comparative analysis of adenovirus fiber-cell interaction: adenovirus type 2 (Ad2) and Ad9 utilize the same cellular fiber receptor but use different binding strategies for attachment.  
*J. Virol.* 70, 7614–7621.
- Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G.M., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I., 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.
- Rogers, B.E., Douglas, J.T., Ahlem, C., Buchsbaum, D.J., Frincke, J., Curiel, D.T. (1997).**  
Use of a novel cross-linking method to modify adenovirus tropism.  
*Gene Ther.* 4, 1387–1392.
- Romano, G., Pacilio, C., Giordano, A. (1998).**  
Gene transfer technology in therapy: Current applications and future goals.  
*The Oncologist* 3, 225–236.
- Rosen, L. (1958).**  
Hemagglutination of adenoviruses.  
*Virology* 5, 574.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gillmore, L.K., Parrott, R.H., 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.
- Rowe, W.P., Hartley, J.W., Huebner, R.J. (1958).**  
Serotype composition of the adenovirus group.  
*Proc. Soc. exp. Biol.* 97, 465–470.
- Ruigrok, R.W.H., Barge, A., Albiges-Rizo, C., Dayan, S. (1990).**  
Structure of adenovirus fiber. II. Morphology of single fibers.  
*J. Mol. Biol.* 215, 589–596.
- Ruoslahti, E. (1996).**  
RGD and other recognition sequences for integrins.  
*Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 697–715.
- Salone, B., Martina, Y., Piersanti, S., Cundari, E., Cherubini, G., Franqueville, L., Failla, C.M., Boulanger, P., Saggio, I. (2003).**  
Integrin  $\alpha_5\beta_1$  is an alternative cellular receptor for adenovirus serotype 5.  
*J. Virol.* 77, 13448–13454.

**Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977).**

DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463–5467.

**Santis, G., Legrand, V., Hong, S.S., Davison, E., Kirby, I., Imler, J.-L., Finberg, R.W., Bergelson, J.M., Mehtali, M., Boulanger, P. (1999).**

Molecular determinants of adenovirus serotype 5 fibre binding to its cellular receptor CAR.  
J. Gen. Virol. 80, 1519–1527.

**Schmitz, H., Wigand, R., Heinrich, W. (1983).**

Worldwide epidemiology of human adenovirus infections.  
Am. J. Epidemiol. 117, 455–466.

**Segerman, A., Atkinson, J.P., Marttila, M., Dennerquist, V., Wadell, G., Arnberg, N. (2003).**

Adenovirus type 11 uses CD 46 as a cellular receptor.  
J. Virol. 77, 9183–9191.

**Sheppard, M., Trist, H. (1992).**

Characterization of the avian adenovirus penton base.  
Virology 188, 881–886.

**Shuang, H., Endo, R.I., Nemerow, G.R. (1995).**

Upregulation of integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery.  
J. Virol. 69, 2257–2263.

**Sprengel, J., Schmitz, B., Heuss-Neitzel, D., Zock, C., Doerfler, W. (1994).**

Nucleotide sequence of human adenovirus type 12 DNA: comparative functional analysis.  
J. Virol. 68, 379–389.

**Stannard, L. (2004).** <http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/adenov.html>**Stewart, P.L., Chiu, C.Y., Huang, S., Muir, T., Zhao, Y., Chait, B., Mathias, P., Nemerow, G.R. (1997).**

Kryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization.  
EMBO J. 16, 1189–1198.

**Stouten, P.F.W., Sader, C., Ruigrock, R.W.H., Cusack, S. (1992).**

New triple-helical model for the shaft of the adenovirus fibre.  
J. Mol. Biol. 226, 1073–1084.

**Sudhanshu, V., Brookes, D.E., Strike, P., Khatri, A., Boyle, D.B., Both, G.W. (1996).**

Unique genome arrangement of an ovine adenovirus: identification of new proteins and proteinase cleavage sites.  
Virology 220, 186–199.

**Suresh, M., St. Cyr, S., Sharma, J.M. (1995).**

Molecular cloning and sequence analysis of the penton base genes of type II avian adenoviruses.  
Virus Res. 39, 289–297.

**Sussenbach, J.S. (1984).**

The structure of the genome.  
In: Ginsberg, H.S. (ed.), The adenoviruses. Plenum Press, New York und London, 35–124.

**Swenson, P.D., Lowens, M.S., Celum, C.L., Hierholzer, J.C. (1995).**

Adenovirus types 2, 8, and 37 associated with genital infections in patients attending a sexually transmitted disease clinic.  
J. Clin. Microbiol. 33, 2728–2731.

**Tomko, R.P., Xu, R., Philipson, L. (1997).**

HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3353–3356.

**Van Oostrum, J., Burnett, R.M. (1985).**

Molecular composition of the adenovirus type 2 virion.  
J. Virol. 56, 439–448.

**Varga, M.J., Weibull, C., Everitt, E. (1991).**

Infectious entry pathway of adenovirus type 2.  
J. Virol. 65, 6061–6070.

**Varner, J.A., Cheresh, D.A. (1996).**

Integrins and cancer.  
Curr. Opin. Cell Biol. 8, 724–730.

**Vigne, E., Mahfouz, I., Dedieu, J.-F., Brie, A., Perricaudet, M., Yeh, P. (1999).**

RGD inclusion in the hexon monomer provides adenovirus type 5-based vectors with a fiber knob-independent pathway for infection.  
J. Virol. 73, 5156–5161.

**Vorburger, S.A., Hunt, K.K. (2002).**

Adenoviral gene therapy.  
The Oncologist 7, 46–59.

**Wadell, G. (1990 a).**

Molecular epidemiology of human adenovirus.  
Microbiol. and Immun. 110, 191–204.

**Wadell, G. (1990 b).**

Adenoviruses.  
In: Zuckermann, A.J., Babatvaala, J.E., Pattison, J.R. (eds.),  
Principles and practice of clinical virology. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 267–287.

**Wadell, G., Allard, A., Johannsson, M., Svensson, L., Uhnoo, I. (1994).**

Enteric adenoviruses. In: Kapikian, A.Z. (ed), Viral infections of the gastrointestinal tract.  
Dekker, N.Y..

**Wesseling, J.G., Bosma, P.J., Krasnykh, V., Kashentseva, E.A., Blackwell, J.L., Reynolds, P.N., Li, H., Parameshwar, M., Vickers, S.M., Jaffee, E.M., Huibregtse, K., Curiel, D.T., Dmitriev, I. (2001).**

Improved gene transfer efficiency to primary and established human pancreatic carcinoma target cells via epidermal growth factor receptor and integrin-targeted adenoviral vectors.  
Gene Ther. 8, 969–976.

**Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresh, D.A., Nemerow, G.R. (1993).**

Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment.  
Cell 73, 309–310.

**Wickham, T.J., Filardo, E.J., Cheresh, D.A., Nemerow, G.R. (1994).**

Integrin  $\alpha_v\beta_5$  selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization.  
J. Cell Biol. 127, 257–264.

**Wickham, T.J., Carrion, M.E., Kovesdi, I. (1995).**

Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs.  
Gene Ther. 2, 750–756.

**Wickham, T.J., Roelvink, P.W., Brough, D.E., Kovetsdi, I. (1996).**

Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types.  
Nat. Biotechnol. 14, 570–1573.

**Wickham, T.J., Tzeng, E., Shears II, L.L., Roelvink, P.W., Li, Y., Lee, G.M., Brough, D.E., Lizonova, A., Kovetsdi, I. (1997).**

Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins.  
J. Virol. 71, 8221–8229.

**Wigand, R., Bartha, A., Dreizin, R.S., Esche, H., Ginsberg, H.S., Green, M., Hierholzer, J.C., Kalter, S.S., McFerran, J.B., Pettersson, U., Russell, W.C., Wadell, G. (1982).**

Adenoviridae: Second report.  
Intervirology 18, 169–176.

**Wigand, R., Adrian, T. (1986).**

Classification and epidemiology of adenoviruses. In: Doerfler, W. (ed.), Adenovirus DNA. The viral genome and its expression.  
Martinus Nijhoff Publishing, Boston, Dordrecht, Lancaster. 409–441.

**Wilson, J.M. (1996).**

Adenoviruses as gene-delivery vehicles.  
Mol. Medicine 334, 1185–1187.

**Worgall, S., Busch, A., Rivara, M., Bonnyay, D., Leopold, P.L., Merritt, R., Hackett, N.R., Roelvink, P.W., Bruder, J.T., Wickham, T.J., Kovetsdi, I., Crystal, R.G. (2003).**

Modification to the capsid of the adenovirus vector that enhances dendritic cell infection and transgene-specific cellular immune responses.  
J. Virol. 78, 2572–2580.

**Yang, Y., Li, Q., Ertl, H.C.J., Wilson, J.M. (1995).**

Cellular and humoral immune response to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses.  
J. Virol. 69, 2004–2015.

**Yang, Y., Su, Q., Wilson, J.M. (1996).**

Role of viral antigens in destructive cellular immune responses to adenovirus vector-transduced cells in mouse lungs.  
J. Virol. 70, 7209–7212.

**Zabner, J., Freimuth, P., Puga, A., Fabrega, A., Welsh, M.J. (1997).**

Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection.  
J. Clin. Invest. 100, 1144–1149.

## 8 LEBENS LAUF

### persönliche Daten

**Name:** Christian Moritz  
**Geburtsdatum:** 10. Juni 1969  
**Geburtsort:** Celle  
**Familienstand:** verheiratet, eine Tochter

### Schulbildung

**1975 – 1979** Grundschule Edemissen  
**1979 – 1981** Orientierungsstufe Edemissen  
**1981 – 1989** Gymnasium am Silberkamp, Peine  
Schulabschluß: Abitur

### Studium

**1992 – 1999** Humanmedizin an der Med. Hochschule Hannover  
**21. Juni 1999** III. Staatsexamen, Teilapprobation

### Berufstätigkeit

**1989** Eintritt in die Bundeswehr, zunächst als Wehrpflichtiger, später als Zeitsoldat  
**1999 – 2001** Arzt im Praktikum, anschließend Assistenzarzt im Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz, Abt. Kardiologie, Gastroenterologie und Radiologie  
**2001 – 2004** Truppenarzt im Standortsanitätszentrum Düsseldorf  
**seit 2004** Klinische Weiterbildung zum Facharzt für diagnostische Radiologie im Bundeswehrkrankenhaus Hamburg

Hannover, 6. April 2005

## 9 ERKLÄRUNG

Erklärung nach § 2 Abs. 2, Nrn. 5 und 6 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover:

Ich erkläre, daß die in der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel »Molekulare Charakterisierung der mit dem frühen cytopathischen Effekt assoziierten Domänen der Adenovirus-Pentonbasis« im Institut für Virologie und Seuchenhygiene unter Betreuung von Frau PD Dr. rer. nat. P. Pring-Åkerblom ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel genutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, daß ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Die Sequenzen der vorgelegten Arbeit wurden unter der EMBL-Zugangsnummer AJ249343 veröffentlicht. Teile der Arbeit wurden 1997 unter dem Titel »Molekulare Grundlagen des cytopathischen Effektes (CPE) bei Adenoviren« als Poster bei der Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Hamburg veröffentlicht.

Hannover, 6. April 2005

## **10 PUBLIKATIONEN**

---

Poster »Molekulare Grundlagen des cytopathischen Effektes (CPE) bei Adenoviren«, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Hamburg 1997.



---

## 11 DANKSAGUNG

---

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. em. J. Drescher, Institut für Virologie und Seuchenhygiene der Med. Hochschule Hannover und seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. med. T. Schulz für die Möglichkeit, an ihrem Institut meine Promotion zu erarbeiten.

Besonders danke ich außerdem Frau PD Dr. rer. nat. P. Pring-Åkerblom für die Überlassung des Themas und die stete Unterstützung in jeder Phase meiner Arbeit.

Meiner Frau danke ich für unendliche Geduld, Toleranz und Unterstützung.