

Untersuchungen über Adenovirus 12: Beziehungen zwischen Virus- und Wirtsgenom^{[1][**]}

Von W. Doerfler^[*]

Die hier beschriebenen Experimente haben zum Ziel, das intrazelluläre Schicksal der Desoxyribonucleinsäure (DNS) von Adenoviren des Typs 12 (Ad 12) frühzeitig nach Infektion von Hamsterzellen (BHK 21) zu verfolgen. Es kann gezeigt werden, daß sich Ad12 auf BHK 21-Zellen nicht vermehren. Strohl et al.^[2] wiesen nach, daß BHK 21-Zellen durch Ad12, die zur Gruppe der stark onkogenen Viren gehören, transformiert werden können.

Die DNS von Ad12 kann von BHK 21-DNS durch Gleichgewichtszentrifugation im CsCl-Dichtegradienten getrennt werden ($\Delta\rho = 0,006 \text{ g ml}^{-1}$). Dieser geringe Dichteunterschied kann vergrößert werden, indem die BHK 21-Zellen in 5-bromdesoxyuridin-haltigem Medium gezüchtet werden. Solche Zellen wurden mit hohen Multiplizitäten von gereinigtem Ad12 infiziert, dessen DNS mit $[^3\text{H}]$ -Thymidin markiert worden war. Zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und die gesamte DNS durch Pronase-Phenol-Behandlung des Lysates und Gleichgewichtszentrifugation in CsCl isoliert. Im CsCl-Dichtegradienten wurde anschließend die $[^3\text{H}]$ -Verteilung zwischen der zellulären und der Virus-DNS bestimmt. Dabei wurde die Position von Virus-DNS durch $[^{14}\text{C}]$ -markierte Ad12-DNS festgelegt. Zelluläre DNS tritt bei höherer Dichte als Virus-DNS auf. Bis zu etwa 16 Std. nach Infektion findet man die gesamte $[^3\text{H}]$ -Aktivität in der Position der Virus-DNS. Ab 20 Std. nach Infektion erscheint ein zunehmender Anteil der $[^3\text{H}]$ -Aktivität in der Position der zellulären DNS, während die $[^3\text{H}]$ -Aktivität in der Position der Virus-DNS abnimmt. Dieses Resultat kann durch die folgenden Annahmen erklärt werden:

1. Virus-DNS wird in Gegenwart von 5-Bromdesoxyuridin repliziert und wird dadurch selbst schwer.
2. Virus-DNS wird durch Nucleasen zu Mononucleotiden abgebaut, das entstehende $[^3\text{H}]$ -Thymidin-5'-monophosphat durch Kinasen in $[^3\text{H}]$ -Thymidin-5'-triphosphat (TTP) umgewandelt und in zelluläre DNS reinkorporiert. Die Synthese zellulärer DNS läuft nach Infektion von BHK 21-Zellen mit Ad12 weiter.
3. Das Virusgenom wird ganz oder teilweise an zelluläre DNS gebunden (Integration).

Eine Replikation von DNS des Ad12 in BHK 21-Zellen findet, wenn überhaupt, nur in bisher nicht nachweisbarem Ausmaß statt^[1, 3]. Damit scheidet die erste Möglichkeit aus. Zwischen den Möglichkeiten 2 und 3 kann man unterscheiden, indem man die CsCl-Dichtegradienten-Profile von DNS aus infizierten Zellen in hochmolekularem Zustand ($180 \cdot 10^6$ Dalton) und von DNS vergleicht, die durch Ultraschallbehandlung zu Bruchstücken von $2 \cdot 10^6$ Dalton fragmentiert wurde.

Wie aus Abbildung 1a hervorgeht, würde man bei einer Integration von Virus-DNS nach Fragmentierung der Zell-DNS eine Verschiebung des Maximums der $[^3\text{H}]$ -Aktivität zur Position des Dichtehybrides erwarten. Eine solche Verschiebung, die auf die Abtrennung integrierter Virusgene (Dichtehybrid) von der schweren zellulären DNS zurückzuführen

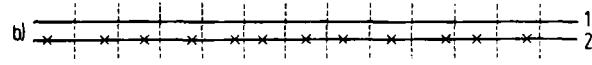
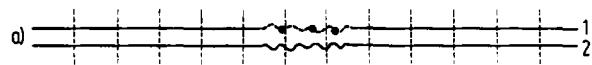


Abb. 1. a) Schematische Darstellung der Integration von Virus-DNS (Ad12) in Zell-DNS (BHK 21).

b) Uninfizierte Kontrollzellen.

---- Bruchstücke der DNS nach Ultraschallbehandlung; 1 alter DNS-Strang; 2 neuer DNS-Strang; — 5-bromdesoxyuridin-enthaltende, schwere Zell-DNS; ~~~ 5-bromdesoxyuridin-enthaltende, schwere Virus-DNS; thymidin-enthaltende, leichte Virus-DNS; ● $[^3\text{H}]$ -Thymidin; × $[^3\text{H}]$ -5-Bromdesoxyuridin.

ist, würde nicht auftreten, wenn $[^3\text{H}]$ -TTP reinkorporiert worden wäre.

Tatsächlich findet man eine solche Verschiebung des Maximums der $[^3\text{H}]$ -Aktivität nach Fragmentieren der DNS von 5-Bromdesoxyuridin-BHK 21-Zellen, die mit $[^3\text{H}]$ -markiertem Ad12 infiziert worden waren. Eine solche Verschiebung wird an der DNS uninfizierter Kontrollzellen nicht beobachtet (Abb. 1b).

Dieses Resultat spricht für die Integration von Virusgenen in die DNS von BHK 21-Zellen. Es treten wahrscheinlich covalente Bindungen auf, da die $[^3\text{H}]$ -Aktivität in der Position höherer Dichte auch im alkalischen CsCl ($\text{pH} > 12$) erhalten bleibt.

[Kolloquium im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, am 2. Juli 1968 in Göttingen] [VB 171]

Untersuchungen über Wirkungsweise, Coenzymbindung und Struktur der Hefe-Pyruvat-Decarboxylase

Von J. Ullrich^[*]

Bei enzymatischen Pyruvat-Decarboxylierungen mit Thiaminpyrophosphat (TPP) als Coenzym läßt sich $(-)$ -2- α -Hydroxyäthyl-TPP (HETPP) abfangen, anreichern und isolieren^[1]. Dieses wird an Apoenzymen viel langsamer umgesetzt als Pyruvat an den TPP-gesättigten Holoenzymen^[1]. HETPP rekombiniert infolge sterischer Hinderung sehr schlecht mit Apo-Pyruvat-Decarboxylase^[2], außerdem spaltet es sein α -Proton nur schwer wieder ab^[3] unter Rückbildung des bei der Decarboxylierung zuerst entstandenen α -Carbanions. Daher wurde vermutet, daß das primäre α -Carbanion des HETPP im aktiven Zentrum der Pyruvat-Decarboxylase vor Einfang eines Protons aus dem Medium weiterreagiert. Vor der Freisetzung wird der Acetaldehyd auf die 4'-Aminogruppe des TPP^[2] und möglicherweise weiter auf eine ϵ -Aminogruppe des Proteins übertragen^[2]. Eine noch vom vorhergehenden Acetaldehyd-Rest besetzte 4'-NH₂-Gruppe gibt Anlaß zur Acetoinbildung, die regelmäßig als Nebenreaktion beobachtet wird. In D₂O ist die Basenkatalyse durch die ND₂-Gruppe auf die Hälfte ver-

[*] Dr. J. Ullrich
Biochemisches Institut der Universität
78 Freiburg, Hermann-Herder-Straße 7

[1] H. Holzer, Angew. Chem. 73, 721 (1961).

[2] A. Schellenberger, Angew. Chem. 79, 1050 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. 6, 1024 (1967).

[3] J. Ullrich u. A. Manschreck, European J. Biochem. 1, 110 (1967); J. J. Miegel, R. G. Votaw, L. O. Krampitz u. H. Z. Sable, Biochim. biophysica Acta 141, 205 (1967).

[*] Dr. W. Doerfler

The Rockefeller University
New York, N.Y. 10021 (USA)

[**] Diese Untersuchungen wurden vom United States Public Health Service, Grant No. AI-03445 unterstützt.

[1] Vgl. W. Doerfler, Proc. nat. Acad. Sci. USA 60, 636 (1968).

[2] W. A. Strohl, A. S. Rabson u. H. Rouse, Science (Washington) 156, 1631 (1967).

[3] W. Doerfler, noch unveröffentlicht.

langsam, die Acetoinbildung nicht. Eine weitere Stütze für die Übernahme des nicht protonierten Acetaldehyd-Restes ist die Nichtablösung des Hydroxymethyl-Restes nach Decarboxylierung von Glyoxylat [2], denn beim Fehlen der Methylgruppe haben Protonen aus dem Medium leichter Zutritt und können das α -Carbanion absättigen, bevor die 4'-NH₂-Gruppe angreift.

Zur weiteren Klärung wurden Untersuchungen über die Struktur des Proteins begonnen. Hefe-Pyruvat-Decarboxylase hat ein Molekulargewicht von ca. 170000 [4] und besitzt vier Bindungsstellen für TPP und Mg²⁺, von denen drei fest, eine nur locker binden [4]. In 6 M Guanidin-HCl entstehen zwei Untereinheiten, die auch in Gegenwart von 10 mM Mercaptoäthanol nicht weiter gespalten werden. Das Protein ist reich an lipophilen und allen aromatischen Aminosäuren sowie Prolin, dagegen recht arm an Cystein. TPP und Mg²⁺ bilden mit ihm reversibel und unabhängig voneinander an verschiedenen Stellen Salze mit Michaelis-Menten-Charakteristik [2]. Bei Besetzung mit beiden und pH = 6,8 erfolgt unter Konformationsänderung des Proteins „Einrasten“ [2] zum stabilen ternären Komplex des Holoenzymes. Die Konformationsänderung ist meßbar an einer geringen Abnahme der Extinktionen um 190 nm und 280 nm, der spezifischen Drehung und des Moffit-Parameters b_0 sowie einer entsprechenden Änderung des Circular dichroismus. Der pauschal erreichbare α -Helix-Gehalt erhöht sich von 23–25% auf ca.

[4] J. Ullrich, J. H. Wittorf u. C. J. Gubler, Biochim. biophysica Acta 113, 595 (1966).

27%. Die vorwiegend vom Tryptophan herrührende Fluoreszenz des Proteins wird teilweise gelöscht, wohl infolge Wechselwirkung eines Teils der ca. 20 Tryptophangruppen im Pyruvat-Decarboxylase-Molekül mit TPP. Rekombiniert man statt mit TPP mit Thiochromopyrophosphat, so wird dessen Fluoreszenz stark erhöht [5]. 2-Toluidinyl-naphthalin-6-sulfonat, ein nur in lipophiler Umgebung stark fluoreszierender Farbstoff, der sich an ausreichend große lipophile Bereiche von Proteinen anlagert [6], wird aus seiner Bindung an Apo-Pyruvat-Decarboxylase durch TPP und Mg²⁺ zur Hälfte irreversibel verdrängt. TPP oder Mg²⁺ allein sind unwirksam. Die andere Hälfte wirkt als kompetitiver Inhibitor für die Pyruvat-Decarboxylierung. Beide „Sorten“ Toluidinyl-naphthalinsulfonat befinden sich also im aktiven Zentrum oder in seiner größten Nähe. Sonst gibt es anscheinend keine genügend großen lipophilen Bereiche an der Oberfläche des Enzyms. Offenbar sitzt das TPP in einer lipophilen Tasche, die sich beim Einrasten zum ternären Komplex bildet (vgl. [2]). Auch ihr Eingang und ihre nächste Umgebung scheinen lipophil. Damit ist eine wichtige Voraussetzung für ein direktes Weiterreagieren des α -Carbanions erfüllt, nämlich behinderter Zutritt von Protonen aus dem Medium, solange das Coenzym mit Substrat besetzt ist.

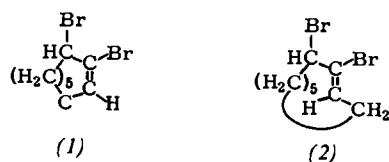
[Colloquium im Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, am 14. Oktober 1968 in Dortmund] [VB 175 IE]

[5] J. H. Wittorf u. C. J. Gubler, persönliche Mitteilung 1968.

[6] W. O. McClure u. G. M. Edelman, Biochemistry 5, 1908 (1966); 6, 559, 567 (1967).

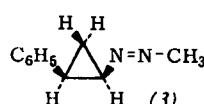
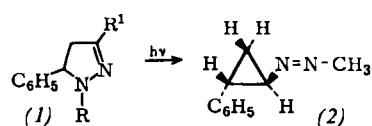
RUNDSCHEAUF

cis- und trans-2,3-Dibromcyclononen (1) bzw. (2) erhielten D. K. Wedegaertner und M. J. Millam bei der Anlagerung von einem mol Brom an 1,2-Cyclononadien in CCl₄. In der Mischung von ca. 40% (1) und ca. 60% (2) konnte gaschromatographisch nur das Isomere (2) stark angereichert werden. Die Strukturen wurden aufgrund des NMR-Spektrums zugeordnet. Es wird keine Allylkopplung beobachtet; offenbar bevorzugen beide Isomeren Konformationen, in denen



die C–H-Bindung des Methinkohlenstoffatoms und die Ebene der Doppelbindung einen Winkel nahe 0 oder 180° bilden. (1) und (2) wandeln sich bei Raumtemperatur nicht ineinander um. / J. org. Chemistry 33, 3943 (1968) / –Kr. [Rd 946]

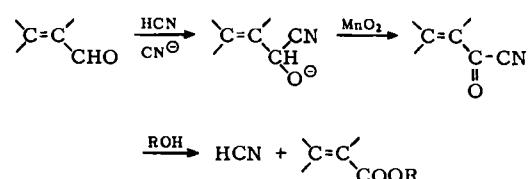
Photoreaktionen von 5-Phenylpyrazolinen untersuchten H. J. Rosenkranz und H. Schmid. Bei Bestrahlung von (1), R = CH₃, R¹ = H, in Benzol mit einem Hg-Hochdruckstrahler



entstehen u.a. *trans*- und *cis*-1-Methylazo-2-phenylcyclopropan (2) bzw. (3), die beim Erhitzen wieder die Ausgangsverbindung zurückbilden. (1), R = R¹ = H, liefert analog *trans*-

und *cis*-1-Methylazo-1-methyl-2-phenylcyclopropan, während aus (1), R = R¹ = H, Benz- und Cinnamaldazin sowie das gemischte Aldazin gebildet werden. / Helv. chim. Acta 51, 1628 (1968) / –Ma. [Rd 950]

Neue Methoden zur Oxidation von Aldehyden zu Carbonsäuren und Estern beschreiben E. J. Corey, N. W. Gilman und B. E. Ganem. Aktives MnO₂ oxidiert konjugiert ungesättigte Aldehyde in Gegenwart von HCN, CN[–] und Methanol zu Carbonsäuremethylestern. Die Reaktion wird z.B. in Essigsäure in Gegenwart von NaCN bei 20–25 °C durchgeführt.



Beispiele: Benzaldehyd, Zimtaldehyd, Furfurol, Geranal, Farnesal → Carbonsäureester, > 95, > 95, > 95, 85–95, 95% Ausbeute. Die Reaktion verläuft ohne *cis-trans*-Isomerisierung der α,β -Doppelbindung. Gesättigte Aldehyde werden unter gleichen Bedingungen nicht in die Ester umgewandelt. AgO gibt, auch aus ungesättigten Aldehyden, nur die Carbonsäuren. / J. Amer. chem. Soc. 90, 5616 (1968) / –Ma. [Rd 949]

1-Chlorbenzotriazol (1), ein neues Oxidationsmittel, beschreiben C. W. Rees und R. C. Storr. (1), Fp = 105–106 °C, das durch Zugabe von wäßrigem Na-Hypochlorit zu Benzotriazol in 50-proz. Essigsäure mit 90% Ausbeute erhalten wird, oxidiert z.B. Alkohole zu Aldehyden oder Ketonen sowie Hydrazoverbindungen zu Azoverbindungen. Die Oxidationen verlaufen unter milden Bedingungen mit hohen Ausbeuten. Das Reagens wird hierbei in Benzotriazolium-