

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 Ad 12 auf BHK 21-Zellen nicht vermehren. Strohl et al.^[2] wiesen nach, daß BHK 21-Zellen durch Ad 12, 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-bromodesoxyuridin-haltigem Medium gezüchtet werden. Solche Zellen wurden mit hohen Multiplizitäten von gereinigtem Ad 12 infiziert, dessen DNS mit $[^3\text{H}]\text{-Thymidin}$ 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 Ad-12-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 Nucleaseen zu Mononucleotiden abgebaut, das entstehende [³H]-Thymidin-5'-monophosphat durch Kinasen in [³H]-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 Fragmentieren der Zell-DNS eine Verschiebung des Maximums der ^{3}H -Aktivität zur Position des Dichtehybrides erwarten. Eine solche Verschiebung, die auf die Abtrennung integrierter Virusgene (Dichtehybrid) von der schweren zellulären DNS zurückzuführen

[*] 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.

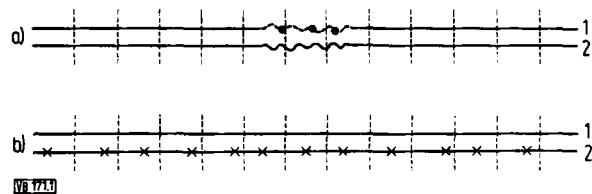


Abb. 1. a) Schematische Darstellung der Integration von Virus-DNS (Ad 12) in Zell-DNS (BHK 21).

b) Uninfizierte Kontrollzellen.

---- Bruchstellen der DNS nach Ultraschallbehandlung; 1 alter DNS-Strang; 2 neuer DNS-Strang; — 5-brom-desoxyuridin-enthaltende, schwere Zell-DNS; ~~~ 5-brom-desoxyuridin-enthaltende, schwere Virus-DNS; ······ thymidin-enthaltende, leichte Virus-DNS; ● [3H]-Thymidin; \times [3H]-5-Bromdesoxyuridin.

ist, würde nicht auftreten, wenn [³H]-TTP reinkorporiert worden wäre.

Tatsächlich findet man eine solche Verschiebung des Maximums der ^3H -Aktivität nach Fragmentieren der DNS von 5-Bromdesoxyuridin-BHK 21-Zellen, die mit ^3H -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}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

Dr. J. Ulrich
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. Mannschreck, 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).