

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Hygiene
Institut für Medizinische Virologie
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Volkhard A. J. Kempf

**Etablierung eines Modells mit lentiviralen Vektoren
zur Untersuchung der onkomodulatorischen Effekte
der immediate-early-Proteine IE1 und IE2
des humanen Cytomegalovirus**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von

Leonie Stephanie Rhein

aus Bensheim

Frankfurt am Main, 2016

Dekan:

Prof. Dr. Josef M. Pfeilschifter

Referent:

Prof. Dr. Jindrich Cinatl

Koreferent:

Prof. Dr. Simone Fulda

Tag der mündlichen Prüfung:

31.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Humanes Cytomegalovirus (HCMV).....	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Klinische Aspekte	2
1.1.3 Partikelmorphologie und Genom	4
1.1.4 DNA-Replikation und Genexpression	6
1.1.5 Immediate early-Proteine IE1 und IE2	10
1.1.6 Tropismus.....	12
1.2 Verwendete Zelllinien	14
1.2.1 Neuroblastom (UKF-NB-3 und UKF-NB-4)	14
1.2.2 Glioblastom (U-251 MG).....	15
1.2.3 Humane Vorhautfibroblasten (HFF).....	16
1.3 Onkomodulation	17
1.3.1 Der Einfluss von IE1 auf die Onkomodulation.....	18
1.4 Enterokinase	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 Verwendete Materialien	23
2.1 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.2 Geräte und Software	23
2.3 Chemikalien und Substanzen.....	25
2.4 Zelllinien	27
2.5 Viren	28

2.6	Lentiviren	28
2.7	Antikörper	29
2.8	Kommerzielle Reaktionskits und Standards	30
2.9	Puffer, Lösungen und Gele.....	30
2.9.1	Zellkultur	30
2.9.2	Infektion	31
2.9.3	Western Blot	33
2.9.4	Labelled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB).....	36
2.9.5	Immunofluoreszenz	37
3	Methoden.....	40
3.1	Zellkultur.....	40
3.1.1	Passagieren.....	40
3.1.2	Selektionieren.....	41
3.1.3	Auftauen von Zelllinien.....	41
3.1.4	Kryokonservierung von Zelllinien	42
3.2	Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung	43
3.3	Multiplizität der Infektion (MOI = <i>Multiplicity of Infection</i>)	43
3.3.1	Berechnung des infektiösen Überstands:	44
3.4	Austestung der geeigneten MOI	44
3.5	Austestung der benötigten Puromycinkonzentration	46
3.6	Transduktion mit Lentiviren	46
3.6.1	Transduktion 1	48
3.6.2	Transduktion 2	48
3.6.3	Transduktion 3	49
3.6.4	Referenztransduktion.....	50
3.7	Infektion mit HCMV.....	51
3.8	Western Blot.....	51
3.8.1	Proteinextraktion.....	51
3.8.2	Bestimmung und Einstellung der Gesamtprotein- konzentration.....	52
3.8.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (= SDS-PAGE)	53
3.8.4	Protein-Transfer (Western Blot)	54
3.8.5	Immunhistochemischer Proteinnachweis.....	55

3.8.6	Bestimmung der relativen Proteinmenge nach Quantifizierung	56
3.9	Labelled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB)	57
3.10	Immunofluoreszenzfärbung (IF-Färbung)	59
4	Ergebnisse	64
4.1	Erarbeitung eines zuverlässigen Protokolls zur Transduktion mit lentiviralen IE1- und IE2-Konstrukten.....	64
4.1.1	Austestung der geeigneten MOI	64
4.1.2	Transduktionsmethoden	66
4.1.3	Festlegung der Referenztransduktion	70
4.2	Etablierung persistent transduzierter Tumor- Zelllinien	70
4.2.1	Austestung der benötigten Puromycin-Konzentration	70
4.2.2	Persistent transduzierte U-251 MG- und UKF-NB-3-Zelllinien im Vergleich.....	72
4.3	Untersuchung der Enterokinaseexpression	75
4.3.1	Akut-Modell U-251MG-Zelllinie	76
4.3.2	Persistent-transduzierte Zellen	85
5	Diskussion	88
6	Zusammenfassung	97
7	Summary	99
8	Literaturverzeichnis	100
9	Anhang	108
9.1	Original Western-Blot-Banden	108
9.2	Dokumentation der IE1-Transduktion von UKF-NB-4.....	109
9.3	Danksagung	110
9.1	Lebenslauf	111
9.2	Schriftliche Erklärung.....	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des HCMV Virion	4
Abbildung 2: Genomaufbau des Cytomegalovirus ¹	6
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Internalisierung von HCMV in HFF bei 37°C ²	7
Abbildung 4: Modell der Internalisierung von HCMV in die Wirtszelle ³	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der HCMV Replikation.....	9
Abbildung 6: Aufbauorganisation und Protein-Produkte der IE1/IE2-Genregion	11
Abbildung 7: Humane Neuroblastomzellen (UKF-NB-3 par. p175), 40x.....	15
Abbildung 8: Humane Glioblastomzellen (U-251 MG par. p102), 40x.....	16
Abbildung 9: Humane Vorhautfibroblasten (HFF p8), 4x.....	16
Abbildung 10: Die wichtigsten onkomodulatorischen Effekte von IE1	19
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Tumorstadiums und -invasion beeinflusst durch Serin-Proteinase und MMPs ⁴	20
Abbildung 12: Empirische Zusammenhänge zwischen HCMV-Infektion, der Expression verschiedener Proteine und der Tumormigration.....	22
Abbildung 13: U-251 MG parental p102; 10x; subkonfluent	44
Abbildung 14: Versuchsanordnung MOI-Austestung; UKF-NB-4 ^{IE1} p208 5d p.t.45	
Abbildung 15: Einführung negativer Ladungen durch SDS	53
Abbildung 16: Bestückung der Blot-Kassette	55
Abbildung 17: Labelled Streptavidin-Biotin-Methode.....	57

Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen der durch LSAB gefärbten IE1-Proteine in Glioblastomzellen	59
Abbildung 19: Unterer Teil der IF-Färbevorrichtung	61
Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach IF-Färbung von Glioblastomzellen	62
Abbildung 21: MOI-Austestung mit Konstrukt IE1 LV963	65
Abbildung 22: MOI-Austestung mit Konstrukt IE2-1 LV1093	65
Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahmen (10x) einer Immediate Early-1-Färbung (SLAB) bei UKF-NB-3 an 5d p.t.	67
Abbildung 24: IE1-Antigen-Expression in HFF-Zellen bestimmt mit SLAB	68
Abbildung 25: Lichtmikroskopische Aufnahme (10x) von HFF nach SLAB	68
Abbildung 26: IE1-Antigen-Expression in U-251 MG Zellen bestimmt mit SLAB	69
Abbildung 27: IE2-Antigen-Expression in U-251 MG Zellen bestimmt mit SLAB	69
Abbildung 28: IE1 und 2-Antigen-Expression in persistent transduzierten UKF-NB-3- und U-251 MG-Zellen bestimmt mit SLAB	72
Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahme (10x) nach SLAB	74
Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach IF-Färbung von U-251 MG ^{IE1} p113-89 an 89d p.t.	75
Abbildung 31: Quantitative Western Blot Auswertungen für IE1-Expression; Mittelwerte und Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsreihen; dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^t und $\tilde{\tilde{n}}_{IE1}^t$ an 1, 3, 5 und 7d p.t. in IE1-transduzierten U-251 MG Zellen	77

Abbildung 32: Quantitative Western Blot-Auswertungen für IE1-Expression; Mittelwerte und Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsreihen; dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^i und $\tilde{\tilde{n}}_{IE1}^i$ an 1, 3, 5 und 7d p.i. in mit HCMV-Hi91 infizierten U-251 MG Zellen	77
Abbildung 33: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Transduktion 1; dargestellt sind $\tilde{n}_{Enterok}^{tn}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enterok}^{tn}$ für $n = 1,3,5,7$ in IE1-transduzierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen	78
Abbildung 34: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Transduktion 2; dargestellt sind $\tilde{n}_{Enterok}^{tn}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enterok}^{tn}$ für $n = 1,3,5,7$ in IE1-transduzierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen	79
Abbildung 35: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Transduktion 3; dargestellt sind $\tilde{n}_{Enterok}^{tn}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enterok}^{tn}$ für $n = 1,3,5,7$ in IE1-transduzierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen	79
Abbildung 36: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Infektion 1; dargestellt sind $\tilde{n}_{Enterok}^{in}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enterok}^{in}$ für $n = 1,3,5,7$ in HCMV-Hi91 infizierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen	80
Abbildung 37: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Infektion 2; dargestellt sind $\tilde{n}_{Enterok}^{in}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enterok}^{in}$ für $n = 1,3,5,7$ in HCMV-Hi91 infizierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen	80
Abbildung 38: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Infektion 3; dargestellt sind $\tilde{n}_{Enterok}^{in}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enterok}^{in}$ für $n = 1,3,5,7$ in HCMV-Hi91 infizierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen	81
Abbildung 39: Western Blot-Auswertungen Transduktion 1	82
Abbildung 40: Western Blot-Auswertungen Transduktion 2	82
Abbildung 41: Western Blot-Auswertungen Transduktion 3	82
Abbildung 42: Western Blot-Auswertungen Infektion 1	83
Abbildung 43: Western Blot-Auswertungen Infektion 2	83

Abbildung 44: Western Blot-Auswertungen; Infektion 3	83
Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in 200facher Vergrößerung einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf DNA (blau) und Enterokinase-Antigen (grün); Transduktion 2.....	84
Abbildung 46: Quantitative Western Blot-Auswertungen: relative IE1- Proteinmenge an Tag 38, 74, 81 und 88 p.t. in U-251 MG ^{IE1} und U-251 MG MOCK	85
Abbildung 47: Quantitative Western Blot-Auswertungen der relativen Enterokinase-Proteinmenge an Tag 38, 74, 81 und 88 p.t. U-251 MG ^{IE1} und U- 251 MG MOCK.....	86
Abbildung 48: Western Blot-Auswertungen; U-251 MG ^{IE1} ; A: dargestellt sind \bar{n}_{IE1}^{tn} für $n = 38, 74, 81, 88$; B: dargestellt sind $\frac{\bar{n}_{Enteroto}^{tn}}{\bar{n}_{Enteroto}^{tn}}$ für $n = 38, 74, 81, 88$	86
Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in 200facher Vergrößerung einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf DNA (blau) und Enterokinase-Antigen (grün) an U-251 MG ^{IE1} und U-251 MG MOCK.	87
Abbildung 50: Empirische Zusammenhänge, zwischen HCMV-Infektion, der Expression verschiedener Proteine und der Tumormigration.....	94
Abbildung 51: Western Blot-Banden drei unabhängiger Transduktionen 1, 3, 5 und 7d p.t.; mit Antikörper gegen IE-, Enterokinase- und β -Actin-Antigen behandelt; U-251 MG ^{IE1} : IE1 transduzierte U 373 MG; MOCK : U-251 MG MOCK; die in Abbildung 31 bis Abbildung 44 aufgeführten relativen Proteinmengen wurden aus diesen Western Blots ermittelt	108
Abbildung 52: Western Blot-Banden drei unabhängiger Infektionen 1, 3, 5 und 7d p.i.; mit Antikörper gegen IE-, Enterokinase- und β -Actin-Antigen behandelt	108
Abbildung 53: Western Blot-Banden der U-251 MG ^{IE1} 38, 74, 81 und 88d p.t.; mit Antikörper gegen IE-, Enterokinase- und β -Actin-Antigen behandelt.....	109

Abbildung 54: Lichtmikroskopische Aufnahmen von UKF-NB-4 p177 4h nach
Transduktion mit IE1; 10x..... 109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht humanpathogener Herpesviren ¹	2
Tabelle 2: Primärantikörper	29
Tabelle 3: Sekundärantikörper	29
Tabelle 4: Passagierinformationen	41
Tabelle 5: Puromycinkonzentrationen zur Austestung	46
Tabelle 6: Transduktionsmethoden	47
Tabelle 7: Volumina bei Referenztransduktion bzw. Infektion	50
Tabelle 8: Verfahren mit Primärantikörper	55
Tabelle 9: Festgelegte MOI	66
Tabelle 10: Bestimmung der lebenden Zellen nach Passagieren mit verschiedenen Puromycin-Konzentrationen	71

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGFR	epidermal growth factor receptor = epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EK	Enterokinase; Enteropeptidase
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
gB	Glykoprotein B
H_2O_2 30%	Wasserstoffperoxid 30%
HCL	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HFF	Human foreskin fibroblasts = humane Forhautfibroblasten
HHV	humanes Herpesvirus
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IE1	Immediate Early 1
IE2	Immediate Early 2
IF	Immunofluoreszens
IHC	Immunhistochemie

IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Kulturmedium
INSS	International Neuroblastoma Staging System
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes-Herpesvirus
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin-Methode
MIEP	major IE promoter-enhancer
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MOCK	Nicht infizierte Kontrolle; von englisch <i>to MOCK</i> "etwas vortäuschen"
MOI	Multiplicity of infection = Multiplizität der Infektion (= Viruspartikel pro Zelle)
p.i.	post infectionem
p.t.	post transduction (nach Transduktion)
par.	Parental
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pRb	Retinoblastom-Protein
PTLD	Prosttransplantative lymphproliferative Erkrankung
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate = Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TLR	Toll-like Rezeptor
TRL	terminal repeat long
TRs	terminal repeat short
UL	unique long
US	unique short
VZV	Varicella-Zostervirus
WB	Western Blot

1 Einleitung

1.1 Humanes Cytomegalovirus (HCMV)

1.1.1 Taxonomie

HCMV gehört zu der Familie der *Herpesviridae*. Allen Viren dieser Familie sind die Partikelmorphologie, die lytische Vermehrung und die nach Primärinfektion lebenslange Persistenz gemein. Das virale Genom liegt als Episom im Zellkern vor, die Persistenz der Herpesviren geht ohne Integration in das Wirtsgenom einher.¹

Herpesviren kommen sowohl bei Mensch als auch bei Tier vor. Bisher sind acht humanpathogene Arten der *Herpesviridae* bekannt (Tabelle 1: Übersicht humanpathogener Herpesviren). Die Mitglieder der *Herpesviridae* werden aufgrund ihrer unterschiedlichen biologischen Eigenschaften wie Pathogenität, Vermehrungseigenschaften und Permissivität in drei Subfamilien kategorisiert:¹

α-Herpesviren: Sie zeichnen sich durch ein breites Wirtszellspektrum, *in vitro* durch einen relativ kurzen Replikationszyklus sowie eine schnelle Ausbreitung und *in vivo* durch eine Persistenz in Ganglienzellen aus.

β-Herpesviren: Sie zeichnen sich durch ein enges Wirtszellspektrum, einen relativ langen Replikationszyklus und dadurch eine langsame Ausbreitung *in vitro* aus. Die infizierten Zellen erscheinen meist vergrößert (Cytomegalie).

γ-Herpesviren: Sie weisen ein sehr spezifisches Wirtszellspektrum auf und replizieren sich vorzugsweise in lymphatischen Zellen. Die Viren dieser Unterfamilie haben unterschiedlich lange Replikationszyklen und weisen ein onkogenes Potential auf.

Tabelle 1: Übersicht humanpathogener Herpesviren¹

Unterfamilie	Genus	Humanpathogenes Virus	Klinik
α	Simplexvirus	humanes Herpesvirus 1 (HHV-1; Herpes-simplex-Virus 1, HSV-1)	Herpes labialis; Herpes genitalis
		humanes Herpesvirus 2 (HHV-2; Herpes-simplex-Virus 2, HSV-2)	Herpes genitalis; Herpes labialis
	Varicellovirus	humans Herpesvirus 3 (HHV-3; Varicella-Zostervirus, VZV)	Varizellen; Herpes Zoster
β	Cytomegalovirus	humanes Herpesvirus 5 (HHV-5; humanes Cytomegalovirus, HCMV)	kongenitale Erkrankungen; Retinitis; Colitis; Enzephalitis; Pneumonie
	Roseolovirus	humanes Herpesvirus 6 (HHV-6)	Exanthema subitum
		humanes Herpesvirus 7 (HHV-7)	Exanthema subitum
γ	Lymphocryptovirus	humanes Herpesvirus 4 (HHV-4; Epstein-Barr-Virus, EBV)	Infektiöse Mononukleose; Burkitt-Lymphom; posttransplantative lymphproliferative Erkrankung (PTLD)
	Rhadinovirus	humanes Herpesvirus 8 (HHV-8; Kaposi-Sarkom-assoziiertes- Herpesvirus, KSHV)	Kaposi-Sarkom; multi- zentrische Castleman- Erkrankung; primäres Effusionslymphom

1.1.2 Klinische Aspekte

Der Mensch stellt für HCMV das einzige Erregerreservoir dar. Abhängig von dem sozioökonomischen Status sind in Deutschland zwischen 40 und 90 Prozent der Bevölkerung infiziert. Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt zum einen auf direktem Weg (iatrogen) durch Bluttransfusionen, Organtransplantationen und intrauterin oder auf indirektem Weg durch Schmier- und Tröpfcheninfektion. Das Virus kann in Blut, Kot, Urin, Speichel, Tränenflüssigkeit, Sperma, Vaginalsekret und vor allem Muttermilch nachgewiesen werden. Häufig erfolgt die Primärinfektion bereits im Säuglings- und Kleinkindalter. Zum einen, weil Säuglinge häufig bereits über die Muttermilch infiziert werden, da bei seropositiven Müttern in der Stillphase das Virus reaktiviert wird und sie es mit der Muttermilch ausscheiden.¹ Darüber

hinaus wird zwar HCMV lebenslang intermittierend ausgeschieden, jedoch ist bei Kindern im Alter bis vier Jahren die Kontagiosität am höchsten und sie infizieren sich gegenseitig. Nach der Infektion beträgt die Inkubationszeit vier bis acht Wochen. Je nach Immunstatus und Lebensalter der Patienten zeigen sich ganz unterschiedliche Erscheinungsbilder. Bei den meisten immunkompetenten Individuen verläuft die Primärinfektion asymptomatisch. Jedoch kommt es in seltenen Fällen zu mononukleose-ähnlichen Erkrankungszeichen wie grippeähnlichem Krankheitsgefühl, Fieber, zervikaler Lymphadenopathie, atypischer Lymphozytose und Myalgien. Als spezifische Komplikationen können eine aseptische Meningitis, Hepatitis oder interstitielle Pneumonie auftreten.¹

Eine Ausnahme stellt die intrauterine Infektion da. Sie ist die häufigste kongenitale virale Infektion. Es wird geschätzt, dass eines von 1000 Neugeborenen mit einer intrauterinen Cytomegalieinfektion zur Welt kommt. Die intrauterine Infektion stellt die häufigste Ursache für viral bedingte Embryo- und Fetopathien dar. Diese pränatale Infektion ist überwiegend Folge einer Erstinfektion der Mutter in der Schwangerschaft, wohingegen es bei einer Reaktivierung des HCMV bei der Mutter nur selten zu einer Infektion des ungeborenen Kindes kommt. Die Folgen sind sehr unterschiedlich und reichen von milden Erscheinungsbildern wie Hepatomegalie, Hepatitis und Thrombozytopenie über schwerere wie Mikroenzephalie, geistige Retardierung und Entwicklungsstörungen von Sprache und Gehör, bis hin zu lebensbedrohlichen mit Organdysfunktionen. Peri- und postnatale Infektionen kommen seltener vor und führen meist zu keinen bis milden Symptombildern, wobei die Säuglinge postnatal noch sehr lange große Virusmengen ausscheiden.¹

Auf Grund der Immunsuppression kommt dem HCMV auch in der Transplantationsmedizin und bei AIDS-Patienten eine wichtige Rolle zu. In der Transplantationsmedizin ist es das klinisch wichtigste Virus, wobei die Primärinfektion weitaus schwerer verläuft als die Reaktivierung. Bei immunsupprimierten Patienten finden sich bei Infektion die klinischen Zeichen von Hepatitiden, schwerer Infektion und Entzündungen des Magendarmtraktes,

Chorioretinitis und selten Encephalitis.¹ Für Knochenmarktransplantierte und AIDS-Patienten stellt die interstitielle Cytomegaloviruspneumonie die häufigste Todesursache dar.¹ Darüber hinaus vermutet man eine Mitbeteiligung von HCMV an der Stenosierung von traumatisierten und transplantierten Koronararterien.⁵

Desweiteren kommt HCMV eine spezielle Rolle im Bereich der Onkologie zu, welche Gegenstand momentaner und künftiger Untersuchungen ist. Wenngleich HCMV nicht als onkogenes Mitglied der Herpesviridae angesehen wird, so wurde dieser Punkt jedoch immer wieder diskutiert. Denn HCMV konnte wiederholt mit malignen Erkrankungen und Vorgängen in Verbindung gebracht werden (vgl. 1.3). Aus diesem Grund wurde der Begriff der Onkomodulation vorgeschlagen, welcher in 1.3 dargestellt wird.⁶

1.1.3 Partikelmorphologie und Genom

Das Virion des HCMV ist mit einem Durchmesser von 150 bis 200nm das größte Virus innerhalb der Familie der Herpesviridae. Es hat einen für Herpesviren charakteristischen Aufbau und besteht aus drei Hauptstrukturelementen, der Hüllmembran, dem Tegument und dem Capsid (s. Abbildung 1):^{1,7}

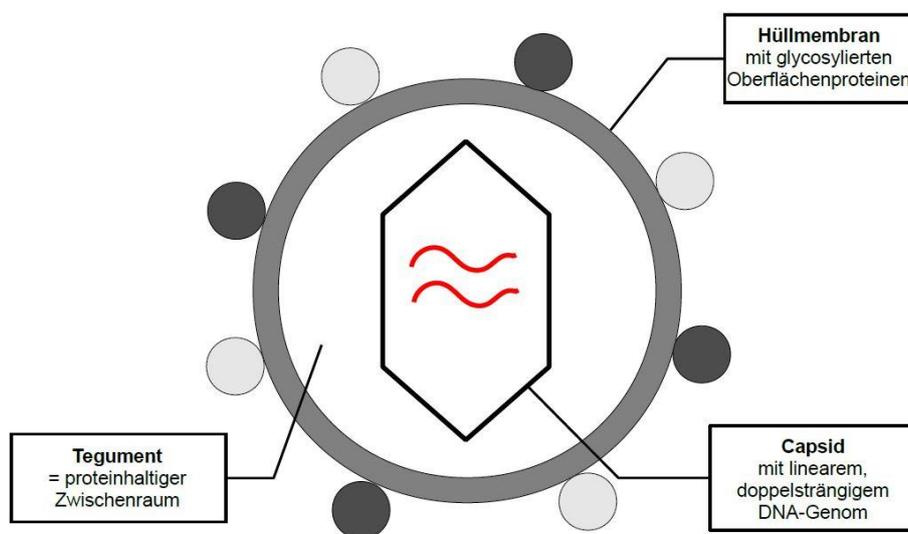


Abbildung 1: Schematische Darstellung des HCMV Virion

Das *ikosaedrische (Nukleo-)Capsid* enthält das Virus-Core. Dabei handelt es sich um eine fibrilläre Proteinmatrix, welche unter dem Elektronenmikroskop einer Spule ähnelt, um welche sich die doppelsträngige, lineare DNA wickelt. Das Capsid hat einen Durchmesser von 90 bis 130nm.

Das Capsid ist eingebettet in das *Tegument*, eine elektronendichte Matrix, welche aus einer Proteinmischung aus bis zu zwanzig Viruskomponenten besteht. Das Protein pp65 stellt die Hauptkomponente des Teguments dar. Dieses Tegumentprotein fördert bei neu entstehenden Virionen die Inkorporation weiterer Viruspartikel in das Tegument und beeinflusst den Tropismus. Ein weiteres wichtiges Tegumentprotein ist pp71, welches die Expression der *immediate early*-Proteine induziert.⁷

Die äußere Umhüllung bildet die *Hüllmembran*, eine Lipid-Doppelmembran, in welche mehrere glykosylierte Oberflächenproteine eingelagert sind. Die Oberflächenproteine dienen im Rahmen der Infektion der Rezeptorerkennung, Adsorption und Penetration. Des Weiteren sind die meisten virusneutralisierenden Antikörper gegen diese Proteinkomplexe gerichtet.¹

Das Genom vom HCMV ist mit einer Größe von 230kbp das größte der Herpesviren und codiert für etwa 200 Genprodukte. Herpesviren werden nicht nur nach ihren biologischen Eigenschaften untergliedert, sondern man teilt sie auch aufgrund ihrer Genomstruktur in sechs Gruppen von A bis F ein. Das HCMV gehört der Gruppe E an⁸ und zeichnet sich durch folgende Genomstruktur aus (s. Abbildung 2):

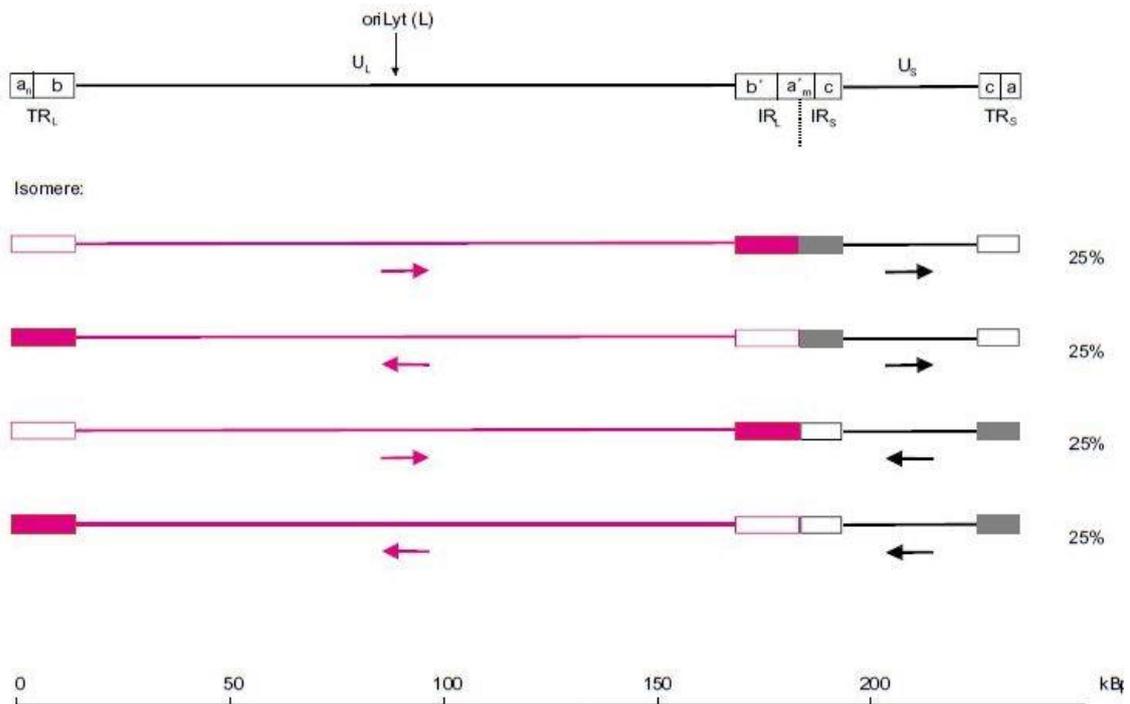


Abbildung 2: Genomaufbau des Cytomegalovirus¹

Es besteht aus zwei nicht repetitiven Segmenten, wobei eines lang (*unique long, UL*) und das andere kurz (*unique short, US*) ist. Die nicht repetitiven Segmente werden von den repetitiven Sequenzen, den *terminal repeats (TRL, TRS)* und den *internal repeats (IRL, IRS)* (*jeweils long oder short*), flankiert und getrennt. Die Nomenklatur der Gene richtet sich nach der Position der Gene in den Segmenten. Durch die intramolekulare Rekombination der Segmente entstehen vier Isoformen.¹

1.1.4 DNA-Replikation und Genexpression

Die Infektion einer Wirtszelle beginnt mit der Adsorption des HCMV Virions. Dies geschieht in einem komplexen, mehrschrittigen Prozess, in welchem das Virion mittels seiner Oberflächenproteine mit bestimmten Strukturen auf der Zelloberfläche der Wirtszelle interagiert (s. Abbildung 3):¹

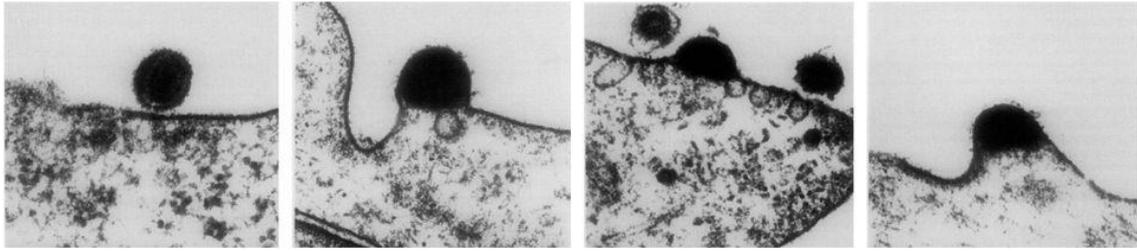


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Internalisierung von HCMV in HFF bei 37°C²

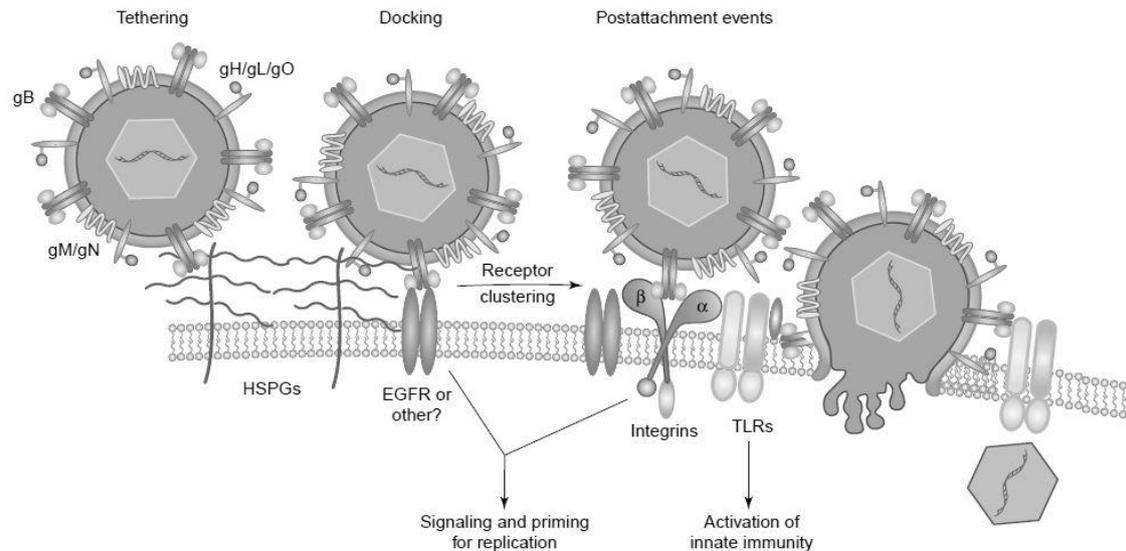


Abbildung 4: Modell der Internalisierung von HCMV in die Wirtszelle³

Die Internalisierung des Virus erfolgt zunächst durch eine unspezifische Kontaktaufnahme (*Tethering*) der viralen Oberflächenproteine gM/gN und dem Glykoprotein B (gB) an Heparansulfatfasern der Proteoglykane (HSPG) an der Zelloberfläche.³ Das feste und spezifische Binden (*Docking*) an der Zelloberfläche geschieht durch gB am epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) (s. Abbildung 4)⁹, wobei möglicherweise auch noch nicht identifizierte Rezeptoren beteiligt sind.³ Die Internalisierung der Viruspartikel erfolgt abhängig von der Wirtszellart durch Fusion oder durch rezeptorvermittelte Endocytose.¹ Letztlich sind an der Internalisierung auch Integrine und toll-like Rezeptoren (TLR) beteiligt.³

Nach der Internalisierung liegt das Capsid mit dem Tegument ohne Virushülle im Cytoplasma der Wirtszelle vor. Hier lagert sich das Capsid an Mikrotubuli an und gelangt so zu den Kernporen. Durch diese gelangt das Genom in das Nukleoplasma und liegt dort als Episom vor. Ebenfalls durch die Kernporen ins

Kernplasma gelangen alle viralen Proteine, welche über ein Kerntransportsignal verfügen. Im Nukleoplasma läuft letztendlich auch die Transkription und Replikation der viralen DNA ab.¹

Die Gen-Expression des Virusgenoms erfolgt in einem kaskadenartig regulierten Zyklus, welchen man in drei zeitlich aufeinanderfolgende Phasen einteilen kann: Die α - (unmittelbar früh, immediate early), die β - (verzögert früh, delayed early) und die γ - (spät, late) Phase.⁸

α -Phase (immediate early, IE): Transaktivator der Genprodukte dieser Phase ist das Tegumentprotein pp71, welches nach Internalisierung in das Nukleoplasma gelangt. Die Aufgabe der IE-Proteine ist die Regulation der viralen Genexpression. So werden sie nach Translation in den Zellkern transportiert und aktivieren hier die Promotoren der *delayed early*-Proteine der β -Phase.¹

β -Phase (delayed early): In der β -Phase steht die Synthese von Proteinen zur DNA-Replikation im Vordergrund. So codieren diese Gene für Enzyme und Nukleinsäure-bindende Polypeptide, welche für die Virus-Replikation erforderlich sind.¹

γ -Phase (late): Die Genprodukte dieser Phase dienen der Virusreplikation. So codieren die Gene für virale Strukturproteine wie Capsid-, Tegument- und Glykoproteine.⁸

Die DNA-Replikation erfolgt im Zellkern unter Zellzyklusarrest in der G_1/G_0 -Phase und folgt dem Prinzip des „rolling circle“ (s. Abbildung 5).¹ Dabei wird die unmittelbar nach Freisetzung lineare DNA durch Fusion der Enden ringförmig. Im Anschluss wird diese ringförmige DNA abgelesen und es entstehen kettenförmig aneinandergereihte Virus-Genome (concatemerische DNA). Diese concatemerische DNA wird nach Spaltung in einzelne Genome schließlich in Capside verpackt.¹⁰

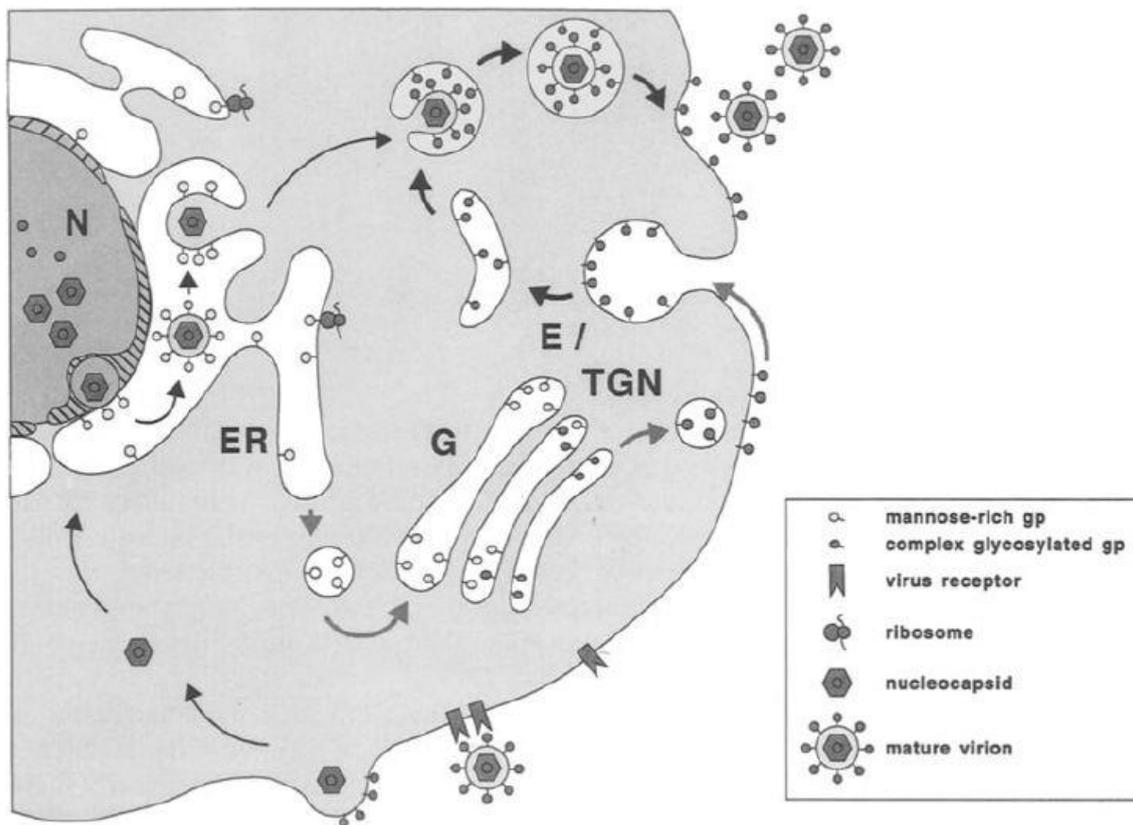


Abbildung 5: Schematische Darstellung der HCMV Replikation:

Nukleus (N), Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat (G), Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und Endosomen (E). Die dünnen schwarzen Pfeile zeigen den Weg der Eltern und Nachkommen Nukleokapside, die grauen Pfeile, die von viralen Glykoproteinen auf dem zellulären Exozytoseweg an die Plasmamembran, und die dicken schwarzen Pfeile das Recycling Glykoproteine zwischen Zellmembran und Endosomen.¹¹

Zeitgleich zur DNA-Replikation werden die Virus-Gene der γ -Phase exprimiert und neue Viruspartikel zusammen- und freigesetzt (s. Abbildung 5). Die Glykoproteine werden an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) gebildet und in den Golgi-Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) modifiziert. Ein Teil der fertigen Glykoproteine assoziiert mit der Membran des TGN, der andere Teil wird zur Zellmembran transportiert und dort eingelagert. Die DNA-haltigen Capside lagern sich an die innere Membran des Kernes an und gelangen von hier aus durch Knospung in perinukleäre Zwischenräume, welche in das Lumen des ER übergehen. Die durch die Knospung entstandene transiente Virushülle verschmilzt wiederum mit der ER-Membran und entlässt das hüllenlose Capsid ins Cytoplasma. Dort trifft es auf die Zysten des TGN, welche an ihrer konkaven, dem Cytoplasma zugewandten Seite

Tegmentproteine und an ihrer konvexen Seite Glykoproteine angelagert haben. Zwischen Tegmentproteinen und Capsid kommt es zu Interaktionen und schließlich wird das Capsid und die Tegmentproteine invaginiert und gelangen so in das TGN. Im TGN reifen die Viruspartikel weiter heran und gelangen an die Zelloberfläche, wo sie durch Exozytose aus der Zelle entlassen werden.¹

Neben dem lytischen Infektionszyklus, dem es zur Lyse und damit Zerstörung der Wirtszelle kommt, hat HCMV wie alle Herpesviren eine Latenz, in welcher es keine Virionen-Produktion gibt und das Transkriptionsprofil stark begrenzt ist.⁷ Man vermutet, dass HCMV-Latenzassoziierte-Transskripte, die zum Teil von der major IE-Promotor (MIEP)-Region kodiert werden, die Ausbildung und Steuerung der Latenz regulieren.¹² Auch der Differenzierungsgrad der infizierten Zellen nimmt Einfluss darauf, ob es zu einem lytischen oder latenten Infektionszyklus kommt. So kommt es in Endothelzellen, Monozyten und myelomonozytären Vorläuferzellen des Knochenmarks zu einer Latenz, wohingegen es in differenzierten Makrophagen zum lytischen Infektionszyklus kommt.^{13, 14}

1.1.5 Immediate early-Proteine IE1 und IE2

Die Genregion der IE1- und IE2-Gene enthält die Leserahmen UL123 und UL122 und steht unter der Kontrolle einer Promotor- und Enhancersequenz, der major IE promoter-enhancer (MIEP). Die MIEP wird durch pp-71 und zelluläre Faktoren aktiviert (s. Abbildung 6).^{1, 8}

Die Proteine der IE1/IE2-Region sind in die IE1- (mit Exon-4-Sequenzen) und IE2- (mit Exon-5-Sequenzen) Unterfamilien unterteilt. Durch differentielles Spleißen, Polyadenylierung und dem Einsatz weiterer Promotoren entstehen verschiedene Versionen der Proteine. Die 72-kDa IE1 und die 86-kDa IE2 Phosphoproteine sind dabei jedoch die häufigsten, wichtigsten und Gegenstand dieser Untersuchung.⁸ Sie werden der Einfachheit halber in dieser Arbeit nur als IE1 und IE2 benannt. Diese beiden Phosphoproteine teilen sich 85 Aminosäuren im aminoterminalen Bereich, codiert durch Exon 2 und 3. Sie besitzen jedoch getrennte carboxyterminale Abschnitte, codiert durch Exon 4 (IE1) bzw. Exon 5 (IE2). Man vermutet, dass sie eine entscheidende Rolle bei

der akuten Infektion und bei der Reaktivierung aus der Latenz spielen. Auch wenn beide Proteine nicht direkt an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind, schaffen sie jedoch optimale Bedingungen dafür, durch Steuerung des Zellzyklus der Wirtszelle. Dabei wirken die beiden Proteine synergistisch und verstärken ihre Wirkung als Transaktivatoren.^{1, 15, 16}

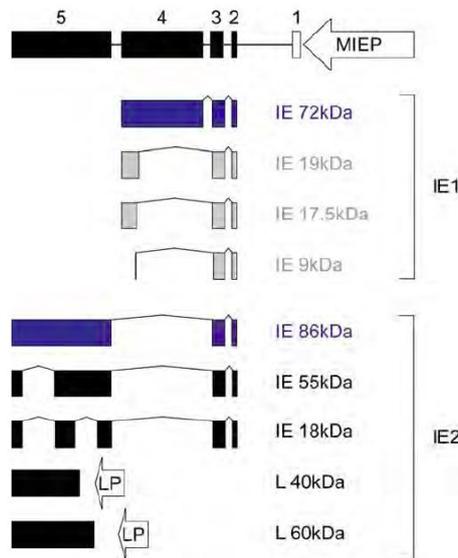


Abbildung 6: Aufbauorganisation und Protein-Produkte der IE1/IE2-Genregion:

Am oberen Rand des Diagramms sind die Längen und die relativen Positionen der Exons 1 bis 5 (das nicht-codierende Exon 1 als offener weißer Kasten dargestellt) und die Lage des MIEP dargestellt. Die Proteine sind in die IE1- (mit Exon-4-Sequenzen) und IE2- (mit Exon-5-Sequenzen) Unterfamilien unterteilt. Die vorherrschenden großen IE-Proteinspezies, die Gegenstand dieser Arbeit sind, sind blau markiert.¹⁵

IE1 ist ein nukleäres Phosphoprotein, welches von den *immediate early*-Proteinen mengenmäßig am meisten gebildet wird und nicht direkt an die DNA der Wirtszelle bindet. Unter einer hohen Multiplizität der Infektion (MOI, Multiplicity of infection = Viruspartikel pro Zelle) kann eine Deletion in der IE1-Region, und somit das Fehlen von IE1, kompensiert werden und eine effiziente Virusreplikation stattfinden. Unter niedriger MOI kommt es jedoch zu einer partiellen Blockade der viralen Gen-Expression und attenuiertem Viruswachstum. Somit nimmt man an, dass IE1 eine Schlüsselrolle der frühen Phase der Infektion zukommt.^{1, 17} Zusätzlich zu seiner Rolle als allgemeiner Transaktivator viraler Gene vermag IE1 auch zelluläre Gene zu aktivieren. So stimuliert es als Koaktivator die Genexpression, indem es die Aktivität des zellulären Transaktivators NFκB verstärkt (vgl. 1.3.1).¹⁸ IE1 stimuliert im

Komplex mit NFκB sowohl die Expression der delayed early und late Gene als auch seine eigenen.¹

Ein weiteres Substrat des IE1-Proteins ist p107, ein Protein aus der Familie der Retinoblastom-Proteine. Als Proteinkinase phosphoryliert IE1 p107, wodurch die Expression von S-Phase-Proteinen induziert und die Zellzyklusmodulation ermöglicht wird (vgl. 1.3.1).¹⁹ IE1 wurde auch als Interaktionspartner der Histondeacetylase 3 (HDAC3) beschrieben. Durch Hemmung der HDAC3 könnte die Chromatisierung verschiedener Promotoren beeinflusst und dadurch die virale Genexpression gefördert werden.²⁰ Des Weiteren schreibt man dem IE1-Protein auch ein anti-apoptotisches, onkogenes und mutagenes Potential zu (vgl. 1.3.1).^{21–23}

Das IE2-Protein ist der wichtigste Aktivator des lytischen Infektionszyklus, reguliert hauptsächlich die Genexpression der frühen Phase und ist so unerlässlich für eine produktive Virusreplikation. Im Gegensatz zu IE1 bindet IE2 direkt an die DNA der Wirtszelle, an die delayed early- und späten Promotoren, man vermutet in Wechselwirkung mit zellulären Transaktivatoren.^{1, 21, 24, 25} Eine wichtige Interaktion von IE2 ist die mit p53. Hierbei hemmt das Virusprotein die p53-Aktivität und somit dessen pro-apoptotische Funktion.²⁶ Darüber hinaus ist IE2 in der Lage, mit dem Retinoblastom-Protein (pRb) zu interagieren und dadurch dessen Fähigkeit, die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie zu binden und so deren Aktivität zu hemmen, zu blockieren.^{27, 28} E2F-Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Expression von Zellzyklusgenen und der DNA-Replikation.²⁹ Man bringt auch die Chromatin-Umstrukturierung während einer HCMV-Infektion mit IE2 in Verbindung, da es in Wechselwirkung mit Histonacetyltransferaseproteinen wie CBP und p/CAF tritt.^{30, 31} Außerdem ist IE2 in der Lage, seinen eigenen Promotor (MIEP) und damit seine Expression zu inhibieren.³²

1.1.6 Tropismus

In vivo kann, bedingt durch ein breites Zielzellspektrum und eine hämatogene Dissemination, praktisch jedes Organ infiziert werden. Zu den primären Zielzellen einer Infektion mit HCMV zählen die ubiquitär vorkommenden Epithel-

und Endothelzellen, Fibroblasten sowie die Zellen der glatten Muskulatur.⁷ Es werden aber auch mehrere Zellarten der myeloiden Leukozyten, wie Makrophagen und Monozyten infiziert. Dadurch kann HCMV deren antivirale Aktivität modulieren, sie antagonisieren und hämatogen disseminieren.³³

In vitro sind einige primäre Zellkulturen permissiv für HCMV. Dazu zählen Endothel- und Epithelzellen, glatte Muskelzellen, neuronale Zellen und Fibroblasten. Darüber hinaus konnte die Virusreplikation in Schilddrüsenepithelzellen³⁴, glattmuskulären Zellen der Arterienwand³⁵ und zentralen Kapillarendothelzellen³⁶ nachgewiesen werden. Unter den primären Zellkultursystemen kommt den Fibroblasten eine besondere Bedeutung im Studium der Virusgenexpression und Virusmorphologie zu, da sie *in vitro* sehr gut mit HCMV infizierbar sind und eine hohe Virusproduktion aufweisen.³⁷

Zusätzlich zu den primären Zellkulturen wurden auch eine Reihe weiterer Zelllinien als für HCMV permissiv beschrieben. Dazu zählen zum Beispiel verschiedene neuronale Tumorzellen wie Glioblastom, Neuroblastom und Oligodendrogliom. Es konnte gezeigt werden, dass Glioblastom- und Neuroblastomzelllinien permissiv sind, wenn sie mit einer hohen Virusdosis infiziert wurden. Oligodendrogliomzellen mussten zunächst mit verschiedenen Substanzen zu reifen Zellen differenziert werden um voll permissiv zu sein. Bei allen drei Zellarten zeigte sich jedoch eine geringere Virusproduktion als bei Fibroblasten.^{38, 39}

Ein weiteres Beispiel sind humane Teratokarzinomzellen, welche mit Retinsäure differenziert wurden und somit permissiv waren.⁴⁰ Auch Zellkulturen von Chorion- und Amnion-Zellen, hergestellt aus humanem fötalen Membrangewebe, zeigten sich nach Inokulation HCMV-permissiv.⁴¹ Immortalisierte humane Fibroblasten, die man durch Transfizieren mit Genen des humanen Papillomavirus erzeugte, blieben permissiv und zeigten einen höheren Virustiter als primäre Fibroblasten.⁴²

1.2 Verwendete Zelllinien

1.2.1 Neuroblastom (UKF-NB-3 und UKF-NB-4)

Beim Neuroblastom handelt es sich um einen embryonalen Tumor, welcher von sympathischen Neuroblasten des Nebennierenmarks oder des Grenzstrangs ausgeht. Er macht sieben Prozent aller kindlichen Krebserkrankungen aus und ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter. 30 Prozent aller Neuroblastom-Patienten sind unter einem Jahr alt. Die Symptome, welche durch den Tumor verursacht werden, richten sich nach dessen Lokalisation, wobei sich 50 bis 70 Prozent aller Neuroblastome intraabdominal befinden.⁴³

Der klinische Verlauf dieser Tumorerkrankung gestaltet sich sehr uneinheitlich. So kommt es zum einen zu Spontanremissionen und zum anderen sind bereits 40 Prozent der Neuroblastome bei Diagnosestellung metastasiert.^{44,45} Die Stadieneinteilung des Neuroblastoms erfolgt nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS) von 1993. Dabei handelt es sich um eine postoperative Einteilung in eines von vier Stadien, welche eine scharfe Abgrenzung der Stadien voneinander zulässt. In Stadium eins bis drei sind die Tumore lokalisiert, bei Stadium 4 liegen bereits Fernmetastasen vor.⁴⁴

Die zwei in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Neuroblastomzelllinien UKF-NB-3 und UKF-NB-4 wurden aus Patientenisolaten des Universitätsklinikums Frankfurt am Main kultiviert und entsprachen INSS-Stadium 4. Sie dienten als Modell einer onkogenen Zelllinie und wurden in der Arbeitsgruppe Cinatl schon häufig zu diesem Zweck verwendet. Auch konnten an diesen Zelllinien die onkomodulatorischen und zellzyklusbeeinflussenden Eigenschaften von HCMV gezeigt werden.^{46, 47}

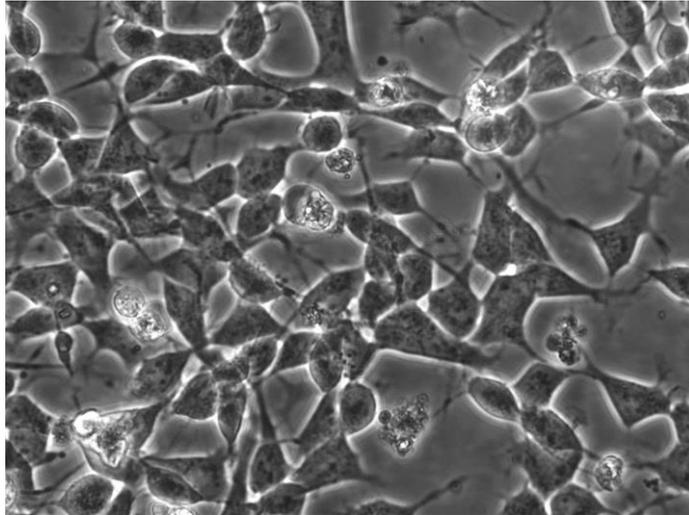


Abbildung 7: Humane Neuroblastomzellen (UKF-NB-3 par. p175), 40x

1.2.2 Glioblastom (U-251 MG)

Das Glioblastoma multiforme ist ein astrozytäres Gliom und der häufigste hirneigene Tumor des Erwachsenen und dritthäufigster Tumor bei Kindern. Dieser Tumor tritt bevorzugt im 50. bis 60. Lebensjahr auf, wobei die Inzidenz bei Männern höher ist als bei Frauen. Es handelt sich beim Glioblastom um einen hochmalignen Tumor, welcher in der WHO-Einteilung der ZNS-Tumore mit Grad IV beurteilt wird. Er zeichnet sich durch ein undifferenziertes, sehr schnelles Wachstum aus. Histologisch zeigen sich Zellpolymorphien bis hin zu Riesenzellen, hohe Mitoseraten und eine ausgeprägte Angiogenese. Die Symptome richten sich auch hier nach der Lokalisation des Tumors, wobei er am häufigsten frontotemporal auftritt und sehr früh metastasiert.^{48, 49}

Die humane Glioblastomzelllinie U-251 MG, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, befindet sich schon lange in der Zellsammlung der Arbeitsgruppe Cinatl und wurde ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

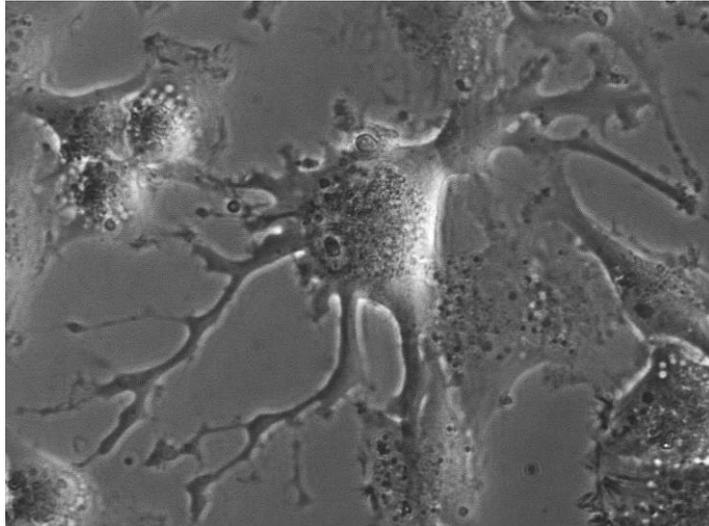


Abbildung 8: Humane Glioblastomzellen (U-251 MG par. p102), 40x

1.2.3 Humane Vorhautfibroblasten (HFF)

Bei humanen Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) handelt es sich um eine Primärzellkultur, deren Lebensdauer *in vitro* limitiert ist. So werden HFF in der Arbeitsgruppe nur bis Passage 15 verwendet, weil die Zellen sich danach morphologisch verändern.

Die in der Arbeit verwendeten HFF wurden aus Patientenisolaten des Universitätsklinikums Frankfurt isoliert, aufbereitet und zählen zu der Zellsammlung der Arbeitsgruppe Cinatl. Da HFF *in vivo* von HCMV infiziert werden und auch *in vitro* sehr gut mit HCMV infizierbar sind, werden sie vielfältig in der HCMV-Forschung als Zellmodell eingesetzt.

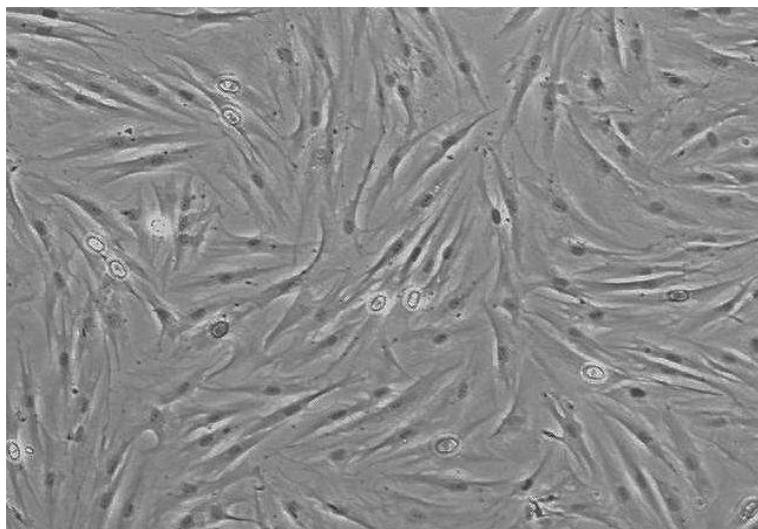


Abbildung 9: Humane Vorhautfibroblasten (HFF p8), 10x

1.3 Onkomodulation

Der Zusammenhang zwischen HCMV und Tumorerkrankungen wird schon seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert.⁶ So zählt HCMV nicht zu den onkogenen Viren und greift nicht direkt in den Transformationsprozess ein. Um jedoch den Einfluss von HCMV auf Tumorgewebe zu beschreiben, wurde der Begriff „Onkomodulation“ vorgeschlagen.⁴⁶ Onkomodulation bedeutet, dass HCMV Tumorzellen infiziert und deren Malignität erhöht. Es wurde postuliert, dass die genetischen Alterationen in Tumorzellen, wie gestörte intrazelluläre Signalwege, Tumorsuppressorgene und Transkriptionsfaktoren, es HCMV erst ermöglichen, seine onkomodulatorischen Eigenschaften zu entfalten, was in gesunden Zellen nicht möglich ist.⁶ Bislang wurden HCMV-Proteine und -Nukleinsäuren in Dickdarm- und Prostatakarzinomen, Brustkrebs und Glioblastomen nachgewiesen, jedoch nicht im umliegenden Gewebe. Daraus kann man schlussfolgern, dass Tumorzellen eine persistente Infektion erlauben.^{50–55}

Die Malignitätserhöhung der Onkomodulation geht einher mit einer Steigerung der Zellproliferation, der antiapoptotischen Eigenschaften, der Tumordinvasion, Migration und der Angiogenese.^{56, 57}

Es zeigte sich im Zellmodell an persistent infizierten Neuroblastomzellen eine verminderte Sensitivität gegenüber Zytostatika im Gegensatz zu nichtinfizierten Zellen.⁵⁸ Diese verminderte Sensibilität gegenüber Zytostatika beruht auf den antiapoptotischen Eigenschaften, welche mit der Onkomodulation des HCMV vergesellschaftet sind. So sind mit HCMV infizierte Neuroblastom- und Kolonkarzinom-Zellen durch die Induktion des antiapoptotischen Proteins bcl-2 vor Apoptose geschützt.^{51, 58} Zudem wurde gezeigt, dass IE2 die Doxorubicin induzierte Apoptose verhindert.⁵⁹

Andere Ergebnisse zeigten eine erhöhte Adhäsion und Transmigration von verschiedenen persistent mit HCMV-infizierten Neuroblastomzelllinien an Endothelzellen gegenüber den nichtinfizierten Kontrollzelllinien.^{60, 61}

1.3.1 Der Einfluss von IE1 auf die Onkomodulation

Wie bereits unter 1.3 aufgeführt, sind die Beeinflussung des Zellzyklus und dadurch der Zellproliferation, die Inhibierung der Apoptose, die Verstärkung der Tumordinvasion und -migration und die positive Beeinflussung der Angiogenese wichtige Komponenten der Onkomodulation (s. Abbildung 10). Der Einfluss von IE1 auf drei dieser Komponenten wurde bereits gezeigt.

So phosphoryliert IE1 als Proteinkinase Proteine der Retinoblastom-Familie (p107 und pRb), wodurch es zur Expression von S-Phase-Proteinen kommt.^{6, 19} Jedoch hat sich auch gezeigt, dass IE1 sowohl inhibierende als auch anstoßende Effekte auf den Zellzyklus hat. So zeigte sich unter stabiler IE1-Expression in zwei Glioblastom-Zelllinien (LN229 und U251) eine Akkumulierung von p53 und der dadurch bedingte Zellzyklusarrest. Wiederum in zwei weiteren Zelllinien (U87MG und U118) kam es durch Beeinflussung von p53 und pRb zur Zellproliferation.⁶²

Ferner nimmt IE1 durch Induktion des Onkogens AKT einen hemmenden Einfluss auf die Apoptose von Tumorzellen.⁶²

Indem es die Aktivität des zellulären Transaktivators NFκB verstärkt, nimmt IE1 potenzierenden Einfluss auf die Angiogenese.^{6, 18}

Obgleich die Tumormigration ein wichtiger Schritt im Verlauf einer onkogenen Erkrankung darstellt, gibt es jedoch nach heutigem Wissensstand noch keine Erkenntnisse über den Einfluss von IE1 auf diese vierte Hauptkomponente der Onkomodulation.

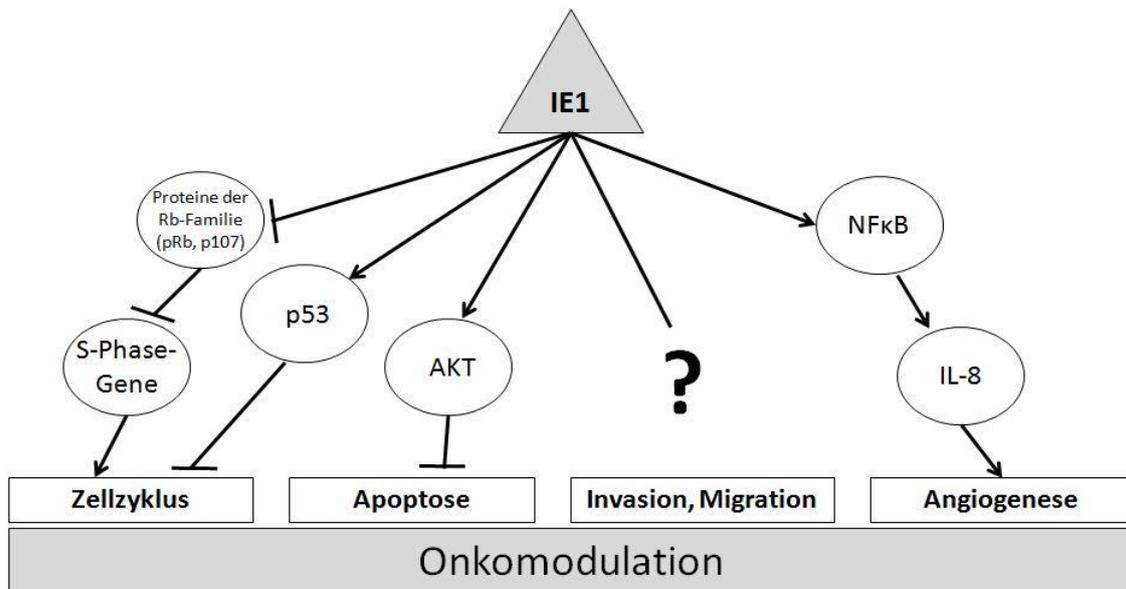


Abbildung 10: Die wichtigsten onkomodulatorischen Effekte von IE1

1.4 Enterokinase

Bei der Enterokinase (= Enteropeptidase; EK) handelt es sich um eine Zellmembran-ständige Serin-Proteinase, welche von der Darmmukosa sezerniert wird, aber auch in geringen Mengen in den meisten anderen Geweben vorkommt.⁴ Die EK spaltet das Proenzym Trypsinogen um ein N-terminales Hexapeptid (= limitierte Proteolyse), wodurch dieses zu seiner kürzeren, aktiven Form Trypsin wird, ebenfalls eine Serin-Proteinase. Im Darmlumen spielt Trypsin eine entscheidende Rolle bei der Proteinverdauung. Eine weitere Funktion dieser beiden Serin-Proteinasen ist zusammen mit weiteren Proteasen wie z.B. den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) der Auf- und/oder Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM), z.B. bei Entwicklungsprozessen, Entzündungen, Verletzungen und Zellmigrationen.^{29, 63}

Ein wichtiger Schritt des Tumorwachstums, der Tumordinfiltration, Metastasierung und Angiogenese ist genau dieser extrazelluläre, proteolytische Prozess im EZM (s. Abbildung 11). Die Serin-Proteinasen EK und Trypsin scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen (s. Abbildung 11).⁶⁴ So kommt es durch in Tumorgewebe exprimiertes Trypsin zum erhöhten Abbau extrazellulärer Proteine und zur Aktivierung der MMP, was die Tumordinfiltration und Metastasierung begünstigt.⁶⁵

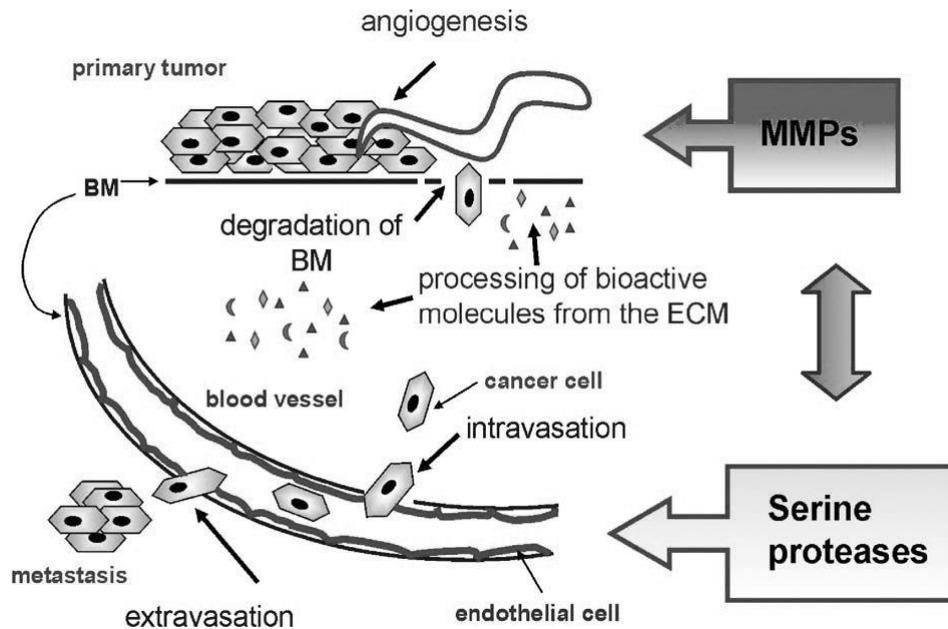


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Tumorentstehung und -invasion beeinflusst durch Serin-Proteinase und MMPs ⁴

Das Substrat der EK, Trypsinogen, fand man bisher in vaskulären Endothelzellen, in Epithelzellen der Haut, Ösophagus, Magen, Lunge, Nieren, Leber, Milz und neuronalen Zellen. Ein weiterer Anhaltspunkt für den Zusammenhang zwischen den Serin-Proteinasen und Tumorerkrankungen liefert die Tatsache, dass man Trypsin in Ovar-, Pankreas-, Leber- und Gallen-Karzinomen und Lungen-Neoplasien nachweisen konnte.^{4, 66}

Darüber hinaus trägt Trypsin zur Tumormigration bei, indem es die Integrin $\alpha 5 \beta 1$ abhängige Adhäsion von Fibronektin stimuliert.⁶⁷ Diese Erkenntnis führt im Zusammenhang mit der Tatsache, dass in persistent mit HCMV infizierten Neuroblastomzellen im Gegensatz zu Nichtinfizierten erhöhte $\alpha 5 \beta 1$ -Aktivität nachgewiesen wurde⁶¹ zu der Annahme, dass die Enterokinase vermittelte Trypsinaktivität eine erhöhte Metastasierung und Tumordinfiltration in persistent HCMV infizierten Tumoren zur Folge hat.⁶⁸

1.5 Zielsetzung der Arbeit

HCMV ist ein Pathogen mit einer weltweit sehr hohen Prävalenz und es stellt nach wie vor ein großes Problem für Immunsupprimierte (AIDS-, Transplantations-Patienten) und für ungeborene Kinder dar. Seine Pathogenese ist weiterhin nur unzureichend bekannt. Ein Einfluss des Virus auf die Tumormalignität konnte gezeigt werden (vgl. 1.1.2 und 1.3). Aber die Aufklärung der der viralen Onkomodulation zugrundeliegenden Mechanismen, insbesondere der Frage, wie und wann Tumorwachstum und -invasion durch HCMV beschleunigt werden, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Somit bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, ein effizientes, zuverlässiges Protokoll zur Herstellung IE1- und IE2-exprimierender Tumorzelllinien mit Hilfe von lentiviralem Gentransfer auszuarbeiten, um die isolierten Auswirkungen von IE1 und IE2 auf humane Tumorzellen untersuchen zu können. Damit verbunden sollten persistent transduzierte, stabil IE-exprimierende Zelllinien für weitere Forschungsarbeiten etabliert werden.

Desweiteren sollte der Aspekt der gesteigerten Tumordinfiltration und Metastasierung HCMV-infizierter Tumore näher beleuchtet werden. Ein Schwerpunkt wurde auf die Frage nach dem Einfluss von IE1 auf die Tumordinvasion gesetzt, da dieser Einfluss eine wichtige, bis jetzt unverstandene Komponente der Onkomodulation zu sein scheint (vgl.1.3.1). Auf der Annahme von Hoever et al 2005 (vgl. 1.4), dass die durch Enterokinase vermittelte Trypsinaktivität eine erhöhte Metastasierung und Tumordinfiltration in persistent HCMV infizierten Tumorzellen zur Folge hat⁶⁸, wurde a-priori die Hypothese erstellt, dass über einen positiven Einfluss von IE1 auf die Enterokinaseexpression die Tumordinvasion gefördert wird (vgl. Abbildung 12).

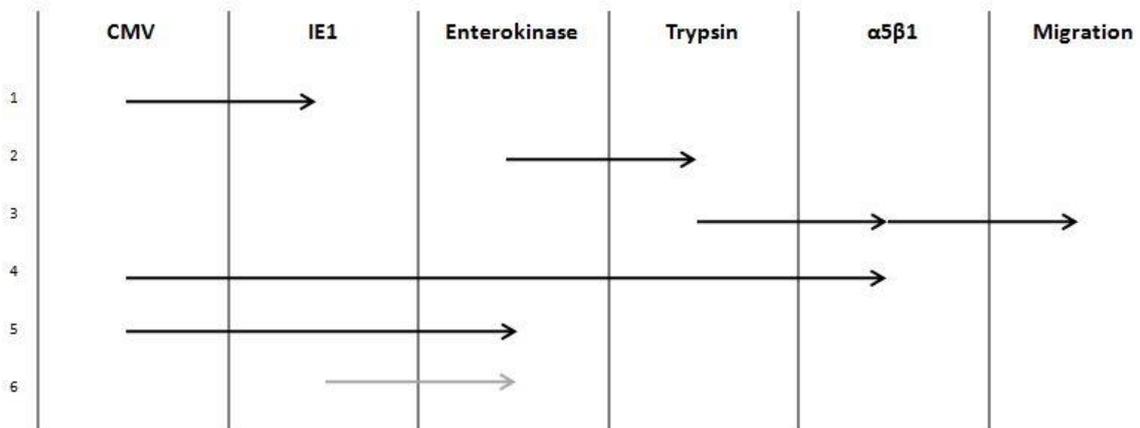


Abbildung 12: Empirische Zusammenhänge zwischen HCMV-Infektion, der Expression verschiedener Proteine und der Tumormigration:

¹ Fields Virology (2001)⁸, ² Koolmann/Röhm (2009)⁶³, ³ Miyata (2000)⁶⁷, ⁴ Scholz (2000)⁶, ⁵ Hoever (2005)⁶⁸, ⁶ a-priori Hypothese

Dementsprechend sollte im zweiten Teil der Arbeit, auf Grundlage des im ersten Teil erarbeiteten Protokolls und der persistent transduzierten U-251-MG-Zellen, der isolierte Einfluss von IE1 auf die Enterokinase-Expression in IE1-transduzierten U-251-MG-Zellen untersucht werden.

2 Verwendete Materialien

2.1 Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Blotting Papier (550g/m ²)	A. Hartenstein
Combitips [®] plus	Eppendorf AG
CyroTubes	Thermo Scientific
Einmalpipetten	Corning Life Sciences
Einmalspritzen	Braun Melsungen
Glasflaschen	Schott AG
Handschuhe (KIMTECH Sterling Nitrile Gloves)	Kimberly Clark Professional
Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	Whatman GE Healthcare
Pipettenspitzen	StarLab GmbH
Reaktionsgefäße (Safe Lock Gefäße)	Eppendorf AG
Sterilfilter (Milltex [®] HA 0,45µm))	Merk Millipore
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One
Zellzählkammerstreifen (Countess [®])	Invitrogen Life Technologies
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One

2.2 Geräte und Software

<u>Geräte</u>	<u>Typenbezeichnung und Hersteller</u>
Analysenwaage	770; Kern und Sohn GmbH
Autoklav	System V-150, System GmbH
Brutschrank	Sanyo CO2 Incubator MCO-20AIC; Sanyo Electric Biomedical Co.
Chemikalienschrank	CS-Phoenix; Asecos GmbH
Durchflusszytometer	FACS Canto II, BD Biosciences

Einkanalpipetten	Reference [®] , Eppendorf AG
Elektrophorese Power Supply	PowerPac HC; Bio-Rad Laboratories
Elektrophorese-System	Mini-PROTEAN [®] 3 Electrophoresis System; Bio-Rad Laboratories
Fluoreszenzmikroskop	IX81; Olympus
Gefrierschrank	Liebherr
Handdispenser	Multipette [®] plus; Eppendorf AG
Infrarotscanner	Odyssey [®] ; LI-COR Biosciences
Kamera für Lichtmikroskop	CC12; Olympus
Kryotank	800 series-190; Chart [®] MVE BioMedical
Kühlschrank	KUB 1740-24; Liebherr
Lichtmikroskop	CKX41; Olympus
Magnetrührer	AGE; VELP Scientifica
Mehrkanalpipetten	Research [®] plus, Eppendorf AG
Mikrowelle	R941INW; Sharp Electronics GmbH
pH-Meter	InoLab pH 730; WTW GmbH
Photometer	Infinite M200; TECAN Group Ltd.
Pipettierhilfe	Pipetboy [®] acu; Integra Biosciences
Präzisionswaage	440-47N; Kern und Sohn GmbH
Proteintransfer-System	Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System; Bio-Rad Laboratories
Reinstwasseranlage	Milli-Q [®] ; Merk Millipore
Rollmischer	RM5-V, Labortechnik Fröbe
Sicherheitswerkbank	Herasafe [®] Heraeus
Vortexmischer	Classic; VELP Scientifica
Zellzählgerät	Countess [®] ; Invitrogen Life Technologies
Zentrifugen	Rotanta 460 R und Mikro200; Andreas Hettich GmbH & Co.KG
<u>Software für</u>	<u>Bezeichnung und Hersteller</u>
Durchflusszytometer	FACS Diva; BD Bioscience

Floureszenzmikroskop	Xcellence pro; Olympus
Infrarotscanner	Image Studio Vers. 2.1.10; LI-COR Biosciences
Lichtmikroskop	Cell^D; Olympus
Photometer	i-control TM 1.5; TECAN Group Ltd.
Zellen zählen	ImageJ 1.49; National Institutes of Health, USA

2.3 Chemikalien und Substanzen

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller/Lieferant</u>
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co.KG
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Benzylpenicillin (10 Mega Penicillin)	Grünenthal GmbH
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Eisessig	Merck KGaA
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Formaldehyd 30% ohne Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co.KG
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), un-supplementiert	Biochrom AG (Merk Millipore)
Laemmli-Puffer, 2x	Serva Electrophoresis GmbH
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co.KG
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co.KG
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH & Co.KG
Natriumacetat wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co.KG

Natriumazid	Carl Roth GmbH & Co.KG
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH
Natriumfluorid	Carl Roth GmbH & Co.KG
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumpyrophosphat	Merck KGaA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG (Merk Millipore)
Protease-Inhibitor Tabletten (complete Mini®)	Roche Diagnostics GmbH
Rinderserum	SML-Cell-Production
Rotiphorese®Gel 30 (Acrylamidstamm-Lösung)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Salzsäure (6M) (HCL)	AppliChem GmbH
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Thimerosal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Titriplex® III (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat)	Merck Serono, Genf, Schweiz
TRIS Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TRIS Hydrochlorid (TRIS/HCL)	AppliChem GmbH
TRIS/Glycin/SDS Laufpuffer, 10x	Bio-Rad Laboratories
Triton X-100	Sigma-Aldrich Buchs
Trypanblau-Lösung 0,4%	Invitrogen Life Technologies
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tween® 20	AppliChem GmbH
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂ 30%)	Merck KGaA
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG

2.4 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
UKF-NB-3 parental (par.)	humane Neuroblastomzelllinie, kultiviert aus Patientenisolat des Universitätsklinikums Frankfurt/Main, INSS-Stadium IV	Zellsammlung AG Prof. Cinatl
UKF-NB-3 ^{IE1}	Persistent mit IE1 LV960 transduzierte humane Neuroblastomzellen (UKF-NB-3 par.)	Teil dieser Arbeit
UKF-NB-3 ^{IE2}	Persistent mit IE2 LV1039 transduzierte humane Neuroblastomzellen (UKF-NB-3 par.)	Teil dieser Arbeit
UKF-NB-4 par.	humane Neuroblastomzelllinie, kultiviert aus Patientenisolat des Universitätsklinikums Frankfurt/Main, INSS-Stadium IV	Zellsammlung AG Prof. Cinatl
HFF	Humane Vorhautfibroblasten, Patientenisolat Universitätsklinikum Frankfurt/Main	Zellsammlung Zentrum der Hygiene, Uniklinikum Frankfurt/Main
U-251 MG par.	Humane Glioblastomzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC)
U-251 MG ^{IE1}	Persistent mit IE1 LV960 transduzierte humane Glioblastomzellen (U-251 MG	Teil dieser Arbeit

	par.)	
U-251 MG ^{IE2}	Persistent mit IE2-1 LV1039 transduzierte humane Glioblastomzellen (U-251 MG par.)	Teil dieser Arbeit

2.5 Viren

Name	Beschreibung	Herkunft
HCMV-Hi91	Humanes Cytomegalievirus = Humanes Herpes-Virus 5	Patientenisolat des Universitätsklinikums Frankfurt/Main

2.6 Lentiviren

Name	Plasmid	Wichtige Genprodukte	Herkunft
IE1 LV960	pLKO.DCMV.TetO. HA-IE1	IE1, Puromycin-Resistenz	Bereitgestellt von PD. Dr. rer. nat.
IE2-1 LV1039	pLKO.DCMV.TetO. cIE2	IE2, Promycin-Resistenz	Michael Nevels; Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg

Das Puromycin-Resistenz-Gen ist ein Selektionsmarker, welcher der transduzierten Zelle eine Resistenz gegen Puromycin verleiht. Da das Antibiotikum Puromycin für Prokaryoten und Eukaryoten toxisch ist, erlaubt die Zugabe von Puromycin in das Kulturmedium eine Selektion der transduzierten Zellen.⁶⁹

2.7 Antikörper

Tabelle 2: Primärantikörper

Bezeichnung	Charakterisierung	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller
Enterokinase	Polyklonal; Kaninchen	1:200 (IF)	NBP1- 55616	Novus Biologicals
IE1	Monoklonal; Maus	1:500 (IF) 1:500 (IHC) 1:1000 (WB)	NEV-1B12 LIE1	Bereitgestellt von PD. Dr. rer. Nat. Michael Nevels;
IE2	Monoklonal; Maus	1:500 (IF) 1:500 (IHC) 1:1000 (WB)	NEV-3A9- LIE2	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Regensburg
PRSS7 (Enterokinase)	Monoklonal; Maus	1:500 (WB)	H0000565 1-Mo1	Abnova
β-Actin	Monoklonal; Maus	1:5000 (WB)	3598-100	BioVision Research Products

Nach den Verdünnungsangaben ist die jeweilige Methode in Klammern angegeben, bei der diese Verdünnung verwendet wurde: Western Blot (WB), Immunofluoreszenz (IF), Immunhistochemie (IHC).

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Bezeichnung	Charakterisierung	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller
Biotin-SP- conjugated Af- finiPure F	Ziege; Anti-Maus	1:1000 (IHC)	115-066- 062	Jackson Immu- no Research Laboratories INC.
FITC Goat An-	Polyklonal;	1:100 (IF)	554020	BD Pharmingen

ti-Rabbit Ig	Ziege; Anti- Kaninchen			TM
Anti-mouse IgG- Phycoerythrin	Polyklonal; Ziege; Anti-Maus	1:100 (IF)	F0102B	R&D systems Inc.
IRDye® 680LT	Polyklonal; Ziege; Anti-Maus	1:20000 (WB)	926-68020	LI-COR Biosciences
IRDye® 800CW	Polyklonal; Ziege; Anti-Maus	1:20000 (WB)	926-32210	LI-COR Biosciences

Nach den Verdünnungsangaben ist die jeweilige Methode in Klammern angegeben, bei der diese Verdünnung verwendet wurde: Western Blot (WB), Immunofluoreszens (IF), Immunhistochemie (IHC).

2.8 Kommerzielle Reaktionskits und Standards

Reagenz

Hersteller

ColorPlus™ Prestained Protein Ladder

NewEngland Biolabs

DC Protein Assay Reagents

Bio-Rad Laboratories

Streptavidin Peroxidase Conjugate

Calbiochem® (Merk Millipore)

2.9 Puffer, Lösungen und Gele

2.9.1 Zellkultur

Rezeptur und Herstellung:

1x PBS

PBS

9,55 g

Milli-Q-Wasser

ad 1000 ml

*Lösen, autoklavieren und bei
Raumtemperatur (RT) lagern.*

L-Glutamin-Lösung	L-Glutamin	29,2 g
	Milli-Q-Wasser	ad 1000 ml
	<i>Lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern</i>	
PenStrep-Lösung	Benzylpenicillin 10M	1 Inj.fl.
	Streptomycinsulfat	10 g
	Milli-Q-Wasser	ad 1000 ml
	<i>Lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern</i>	
Supplementiertes IMDM (Kulturmedium)	PenStrep-Lösung	5 ml
	L-Glutamin-Lösung	10 ml
	FCS	50 ml
	Unsupplimentiertes IMDM	ad 500 ml
	<i>Mischen und für maximal 7 Tage bei +4°C lagern</i>	
Trypsin-Lösung	Trypsin	2 g
	Titriplex® III	0,6 g
	1x PBS	ad 1000 ml
	<i>Lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern</i>	
Verdünnungsmedium	zum 1x PBS	18ml
Auftauen	FCS	2 ml
	Lösung frisch herstellen	

2.9.2 Infektion

Rezeptur und Herstellung:

Supplementiertes IMDM zur	PenStrep-Lösung	5 ml
---------------------------	-----------------	------

Infektion	L-Glutamin-Lösung	10 ml
	FCS	30 ml
	Unsupplimentiertes IMDM	ad 500 ml
	<i>Mischen und für maximal 7 Tage bei +4°C lagern</i>	

2.9.3 Western Blot

Rezeptur und Herstellung:

Triton X-100 Lysepuffer	TRIS/HCl, pH7.5	20 mM
	Natriumchlorid	150 mM
	Natriumfluorid	20 mM
	Natriumpyrophosphat	10 mM
	Triton X-100	1 %
	Aqua dest.	ad 1000 ml
	<i>Lösen und bei +4°C lagern.</i>	

Lysepuffer zur Proteingewinnung	complete Mini®	1 Tbl
	Triton X-100 Lysepuffer	10 ml
<i>Tbl lösen und für maximal 7 Tage bei +4°C lagern</i>		

Probenpuffer	Laemmli-Puffer, 2x	95 Teile
	β-Mercaptoethanol	5 Teile
<i>Frisch vor Verbrauch unter dem Abzug mischen.</i>		

Laufpuffer	TRIS/Glycin/SDS Laufpuffer,	100 ml
	10x	
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>Mischen und bei +4°C lagern.</i>		

Transferpuffer	TRIS Base	30 g
	Glycerin	143 g
	Methanol	200 g
	HCL	bis pH 8,3
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>Mischen und bei +4°C lagern</i>		

Waschpuffer	PBS	19,1 g
	Tween® 20	0,6 ml
	Aqua dest.	ad 2000 ml
<i>Mischen und bei +4°C lagern</i>		
BSA-Blockingpuffer	TRIS/HCL 1M (pH 7,5)	50 ml
	Natriumchlorid	11,68 g
	Tween® 20	0,5 ml
	BSA	30 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml
<i>Lösung herstellen, aliquotieren und bei -20°C lagern.</i>		
Milch-Blockingpuffer	Milchpulver	0,5 g
	Aqua dest.	ad 10 ml
<i>Vor Verbrauch frisch eine Lösung herstellen.</i>		
APS 10%	APS	0,05 g
	Aqua dest.	ad 500 µl
<i>Lösung herstellen, aliquotieren und bei -20°C lagern.</i>		
SDS 10%	SDS	10 g
	Milli-Q-Wasser	ad 100 ml
<i>Lösung herstellen und bei RT lagern.</i>		
Acrylamid-Trenngel 12% (6 Gele)	Milli-Q-Wasser	5,4 ml
	Rotiphorese®Gel 30	9,6 ml
	TRIS/HCL pH 8,8	9 ml
	SDS 10%	240 µl
	APS 10%	180 µl

TEMED 30 µl

Flüssigkeiten unter Rühren mischen, zügig in Gelgießvorrichtung füllen, mit Isopropanol überschichten und 15 bis 20 Minuten polymerisieren lassen.

Acrylamid-Trenngel 15% (6 Gele) Milli-Q-Wasser 3 ml
Rotiphorese®Gel 30 12 ml

TRIS/HCL pH 8,8 9 ml

SDS 10% 240 µl

APS 10% 180 µl

TEMED 30 µl

Flüssigkeiten unter Rühren mischen, zügig in Gelgießvorrichtung füllen, mit Isopropanol überschichten und 15 bis 20 Minuten polymerisieren lassen.

Acrylamid-Sammelgel 5% (6 Gele) Milli-Q-Wasser 7,44 ml
Rotiphorese®Gel 30 1,65 ml

TRIS/HCL pH 6,8 1,32 ml

SDS 10% 105 µl

APS 10% 72 µl

TEMED 13,5 µl

Flüssigkeiten mischen, zügig in Gelgießvorrichtung auf das Trenngel füllen und 30 Minuten polymerisieren lassen.

2.9.4 Labelled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB)

Rezeptur und Herstellung:

Aceton/Methanol-Gemisch	Aceton	40 Teile
	Methanol	60 Teile
<i>Mischen und bei -20°C lagern.</i>		
<hr/>		
Waschpuffer	TRIS Base	4,84 g
	Natriumchlorid	23,6 g
	BSA	2,0 g
	Thimerosal	0,2 g
	Tween® 20	4 ml
	HCL 6M	ca. 15 ml
	Reinstwasser	ad 2000ml
<i>Unter Rühren mischen, mit HCL auf pH 7,45 - 7,5 einstellen und bei +4°C lagern.</i>		
<hr/>		
Blocking Solution	Waschpuffer	800 ml
	BSA	16 g
	Ziegenserum + 0,01% Thimerosal	40 ml
<i>Unter Rühren Lösung herstellen und bei -20°C lagern.</i>		
<hr/>		
Primärantikörper-Lösung	Monoklonaler IE1 oder IE2 – Anti-Mouse-Antikörper	3 µl
	Waschpuffer	ad 1,5 ml
	<i>Lösung zum sofortigen Verbrauch herstellen.</i>	

Lösung des biotinmarkierten Sekundärantikörpers	Biotin-SP-conjugated AffiniPure F Waschpuffer	1,5 µl ad 1,5 ml
<i>Lösung zum sofortigen Verbrauch herstellen.</i>		
Streptavidin-Peroxidase-Lösung	Streptavidin Peroxidase Conjugate Waschpuffer	0,5 µl ad 1,5 ml
<i>Lösung zum sofortigen Verbrauch herstellen.</i>		
Acetat-Puffer pH 5	Natriumacetat wasserfrei Milli-Q-Wasser Eisessig	2,05 g ad 500 ml bis pH 5
<i>Lösung herstellen, mit Eisessig pH auf 5 einstellen und bei RT lagern.</i>		
AEC-Substrat-Lösung	AEC N,N-Dimethylformamid Acetat-Puffer pH 5	180 mg 45 ml 105 ml
<i>AEC in N,N-Dimethylformamid lösen, Acetat-Puffer langsam unter Rühren zugeben und bei +4°C lagern.</i>		
<i>Direkt vor Gebrauch mit 0,45 µm-Filter filtrieren und pro filtriertem ml mit 1 µl H₂O₂ 30% versetzen.</i>		

2.9.5 Immunofluoreszens

Rezeptur und Herstellung:

Formaldehyd-Lösung 3,7%	Formaldehyd 30% ohne Methanol Milli-Q-Wasser	123,33 ml 876,67 ml
<i>Mischen und bei RT lagern.</i>		

Waschpuffer	BSA	0,1 g
	1x PBS	ad 100 ml
<i>Lösung herstellen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.</i>		

Blockingpuffer	Rinderserum	10 ml
	Triton X-100	0,3 ml
	1x PBS	ad 100 ml
<i>Vor Gebrauch frisch herstellen.</i>		

Verdünnungspuffer	BSA	1 g
	Rinderserum	1 ml
	Triton X-100	0,3 ml
	1x PBS	ad 100 ml
<i>Lösung herstellen, mit Antikörper versetzt aliquotieren und bei -20°C lagern.</i>		

Primärantikörperlösung	Polyklonaler Enterokinase-Anti-Ratte-Antikörper	2,5 µl
	Monoklonaler IE1-Anti-Maus-Antikörper	1 µl
	Verdünnungspuffer	ad 500 µl
	<i>Lösung herstellen und aliquotieren bei -20°C lagern.</i>	

Sekundärantikörper	FITC Goat Anti-Rabbit Ig	5 µl
	Anti-mouse IgG-Phycoerythrin	5 µl
	Verdünnungspuffer	ad 500 µl
<i>Lösung zum sofortigen Verbrauch herstellen.</i>		

DAPI-Lösung

DAPI

4 g

1x PBS

ad 10 ml

*Lösung herstellen, aliquotieren und bei -20°C
lagern.*

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien bestanden alle aus adhären wachsenden Zellen, das bedeutet, sie hafteten an der Oberfläche der Zellkulturflaschen an. Alle Zelllinien wurden standardmäßig bei einer Temperatur von 37°C in einer Kulturflasche von 25 cm² und dabei in 10 ml supplementiertem IMDM (Kulturmedium) kultiviert. Bei allen Arbeiten mit der Zellkultur wurde auf eine sterile Arbeitsweise geachtet. Um dies zu gewährleisten, fanden alle Arbeiten unter der Sterilwerkbank statt. Es wurden sterile Verbrauchsmaterialien verwendet, Glaswaren und Lösungen wurden zunächst autoklaviert und eine Öffnung der Materialien erfolgte erst unter der Werkbank.

3.1.1 Passagieren

Die Zelllinien dieser Arbeit wurden zur Kulturhaltung in einem Intervall von sieben Tagen passagiert. Das Vorgehen dabei gestaltete sich wie folgt: Das verbrauchte Kulturmedium wurde abgossen. Im Anschluss wurde der adhären und konfluente Zellrasen zweimal mit 1x PBS gewaschen, um ihn vollständig von FCS-Rückständen zu befreien, da diese den nächsten Arbeitsschritt inhibiert hätten. Dieser Arbeitsschritt beinhaltete das Inkubieren des Zellrasens mit 0,4 ml Trypsin-Lösung zur proteolytischen Ablösung des Zellrasens und Vereinzelung der Zellen. Daraufhin wurden die Zellen mit 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Die proteolytischen Eigenschaften der Trypsin-Lösung wurden durch das im Kulturmedium enthaltene FCS gestoppt. Die Zellsuspension wurde der Splittingrate (s.

Tabelle 4: Passagierinformationen) der jeweiligen Zelllinie entsprechend mit frischem Kulturmedium verdünnt, in eine neue Zellkulturflasche überführt und wenn nötig mit Puromycin selektioniert.

Tabelle 4: Passagierinformationen

Zelllinie	Splittingrate	Puromycinzusatz
UKF-NB-3 parental	1:20	∅
UKF-NB-3 ^{IE1}	1:20	1 µg/ml
UKF-NB-3 ^{IE2}	1:20	1 µg/ml
UKF-NB-4 par.	1:10	∅
HFF	1:3	∅
U-251 MG par.	1:20	∅
U-251 MG ^{IE1}	1:20	5 µg/ml
U-251 MG ^{IE2}	1:20	5 µg/ml

3.1.2 Selektionieren

Um bei den persistent transduzierten Zelllinien eine Reinkultur von transduzierten Zellen zu gewährleisten, wurden diese Zellen mit dem Nucleosid-Antibiotikum Puromycin unter Selektionsdruck gesetzt, indem dieses dem Kulturmedium beigelegt wurde. Die Konzentration, welche benötigt wurde, um die jeweiligen untransduzierten Zellen abzutöten, wurde zunächst ausgetestet (s. 3.5).

3.1.3 Auftauen von Zelllinien

Die sich in einem Cyrotube befindliche Zellsuspensionsmenge von 2 ml wurde kurz in ein Gefäß mit warmem Wasser gelegt. Unter der Sterilwerkbank wurden 20 ml Verdünnungsmedium hergestellt und davon 1,5 ml in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen vorgelegt. Nach Desinfektion des Cyrotubes wurde dieses geöffnet und die Zellsuspension in das Zentrifugengefäß überführt. Im Anschluss wurde das restliche Verdünnungsmedium sehr langsam und schrittweise in das Zentrifugenröhrchen mit der Zellsuspension geträufelt. Nach vollständiger Verdünnung wurde die Zellsuspension fünf Minuten bei 1.600 rpm zentrifugiert. Der bei der Zentrifugation entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet aus Zellen wurde mit 20 ml frischem,

supplementiertem IMDM resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde á 10 ml auf zwei 25 cm²-Zellkulturflaschen aufgeteilt und bei 37°C kultiviert.

3.1.4 Kryokonservierung von Zelllinien

Um auf bestimmte Passagen der Zelllinien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, zurückgreifen zu können und auch um die persistent transduzierten Zellen nach Abschluss dieser Arbeit zu lagern, wurden während dieser Arbeit Zelllinien eingefroren. Dazu wurde die einzufrierende Zelllinie zunächst in zwei 75 cm²-Zellkulturflaschen 100% konfluent hochgezüchtet, um eine ausreichende Zellmenge zu erhalten. Unter der Sterilwerkbank wurden drei 15 ml-Zentrifugen-Röhrchen nach untenstehendem Schema vorbereitet:

1. 9 ml 1x PBS + 1 ml FCS
2. 5,4 ml supplementiertes IMDM + 0,6 ml FCS
3. 4,2 ml supplementiertes IMDM + 0,6 ml FCS + 1,2 ml DMSO

Cyrotubes und Cyrotube-Halter, welcher in der äußeren Kammer mit Isopropanol befüllt ist, wurden bei -20°C vorgekühlt. Eine Kiste mit Eis wurde bereitgestellt. Nun wurde das Nährmedium der zwei 75 cm²-Zellkulturflaschen abgekippt und verworfen. Die Zellen wurden im Anschluss zweimal mit 4 ml 1x PBS gewaschen, um dann mit je 1 ml Trypsin-Lösung 5 Minuten bei RT inkubiert zu werden. Die gelösten Zellen beider Flaschen wurden mit Lösung 1 resuspendiert und dann fünf Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen, das Pellet mit Lösung 2 resuspendiert. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde 30 Minuten bei +4°C heruntergekühlt. Die Cyrotubes und der Cyrotube-Halter wurden zwischenzeitlich in die Kiste mit Eis überführt und bereitgestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis und zügig durchgeführt. Dabei wurde die Zellsuspension mit Lösung 3 vermischt und á 2 ml auf die Cyrotubes verteilt. Die Cyrotubes wurden in den Cyrotube-Halter gestellt, was ein gleichmäßiges Herunterkühlen der Zellsuspension gewährleistete; jenes erfolgte bei -80°C.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen in den Kryotank überführt und dort dauerhaft eingelagert.

3.2 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl und der Viabilität erfolgte mit dem Zellzählgerät Countess® mittels Trypanblau. Das Trypanblau kann als anionischer Diazofarbstoff intakte Zellmembranen von lebenden Zellen nicht überwinden und färbt somit nur tote oder apoptotische Zellen blau an, indem es sich im Zytoplasma dieser Zellen anreichert. Zunächst wurden die Zellen wie unter 3.1 beschrieben gewaschen, mit Trypsin vereinzelt und resuspendiert. Im Anschluss wurden 5 µl der Zellsuspension mit 5 µl Trypanblau-Lösung 0,4% gemischt und unverzüglich in einen Zellzählkammerstreifen eingebracht. Durch optische Bildanalyse ermittelt das Gerät die Gesamtzellzahl, die Zahl der toten und der lebenden Zellen und errechnet daraus die Viabilität in Prozent. Diese Analyse erfolgte immer im Doppelansatz und die erhaltenen Werte wurden gemittelt.

3.3 Multiplizität der Infektion (MOI = *Multiplicity of Infection*)

Die MOI gibt das Verhältnis von infektiösen Partikeln zu Zielzellen wieder. So bedeutet eine MOI von 2, dass auf eine Zielzelle zwei infektiöse Partikel kommen.

$$\text{MOI} := \frac{V_{\text{Virus}} \cdot C_{\text{Virus}}}{V_{\text{Zellkultur}} \cdot C_{\text{Zellkultur}}} = \frac{n_{\text{Virus}}}{n_{\text{Zellen}}}$$

V_{Virus}	=	Volumen des viralen Überstandes
$V_{\text{Zellkultur}}$	=	Volumen der Zellkultur
C_{Virus}	=	Konzentration des viralen Überstandes
$C_{\text{Zellkultur}}$	=	Konzentration der Zellkultur
n_{Virus}	=	Anzahl der Viruspartikel
n_{Zellen}	=	Anzahl der Zellen

3.3.1 Berechnung des infektiösen Überstands:

Um einen normierten Versuchsablauf zu gewährleisten, wurde die verwendete infektiöse Überstandsmenge in den verschiedenen Versuchen mittels der MOI festgelegt und berechnet. Dazu wurde die Zellzahl der zu infizierenden Kultur bestimmt. Die Viruskonzentration war bekannt. Auch die günstigste MOI für die Infektion mit HCMV-Hi91 war in der Arbeitsgruppe mit einer MOI von zwei für Neuroblastom- und Glioblastomzellen bekannt. Bei dem lentiviralen Überstand wurde dies zunächst ausgetestet wie unter 3.3 beschrieben.

Die Berechnung erfolgte dann wie folgt:
$$V_{\text{Virus}} = \text{MOI} \cdot \frac{n_{\text{Zellen}}}{c_{\text{Virus}}}$$

3.4 Austestung der geeigneten MOI

Zur Austestung der geeigneten MOI wurden die Zellen zunächst wie unter 3.1 beschrieben gewaschen, trypsiniert und mit frischem Medium resuspendiert. Darauf folgte das Umsetzen der Zellen in eine 12-Loch-Zellkulturplatte im Verhältnis 1:4 (U-251 MG parental und UKF-NB-4) bzw. 1:8 (UKF-NB-3) mit frischem Kulturmedium. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C in den Brutschrank verbracht. Die Zelldichte nach dieser Inkubationszeit sollte zwischen 30 und 50% (subkonfluent) betragen und wurde unter dem Mikroskop überprüft (vgl. Abbildung 13).

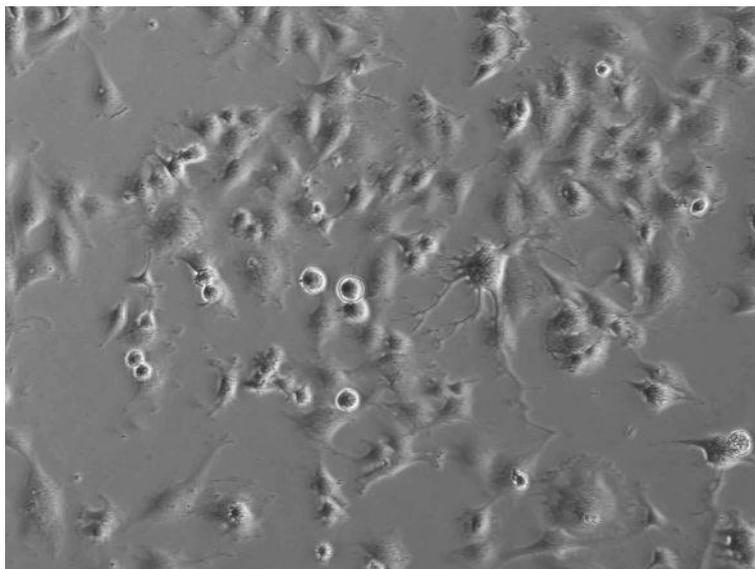


Abbildung 13: U-251 MG parental p102; 10x; subkonfluent

Zur Berechnung der MOI wie oben beschrieben wurde nun die Zellzahl eines Kontroll-Loches bestimmt und exemplarisch für alle Löcher angenommen. Es wurde die benötigte lentivirale Überstandsmenge pro Well für eine MOI von eins, fünf und zehn berechnet. Die berechneten lentiviralen Überstandsmengen wurden mit frischem Kulturmedium jeweils auf ein Volumen von 1 ml verdünnt und vorsichtig auf die Zellkulturen aufgetragen. Darauf folgte leichtes Kreisen der Zellkulturplatte. Es wurden je vier Vertiefungen pro MOI-Wert befüllt. Die Zellkultur wurde im Anschluss zwei Tage bei 37°C mit dem lentiviralen Überstand inkubiert. Danach wurde dieser in allen Vertiefungen abgesaugt und die Zellkulturen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen. Dann wurde 1ml frisches Kulturmedium pro Vertiefung drauf pipettiert, wobei bei je drei von vier Löchern dem Medium Puromycin in einer Konzentration von 1µg/ml zugesetzt wurde (s. Abbildung 14).

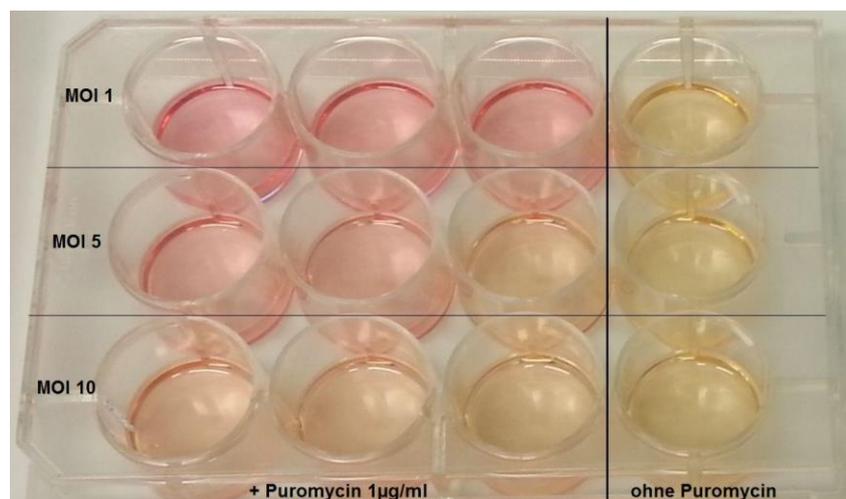


Abbildung 14: Versuchsanordnung MOI-Austestung; UKF-NB-4^{IE1}p208 5d p.t.

Es ist gut zu erkennen, dass es auf Grund der Stoffwechsel- und Verbrauchsprozesse lebender Zellen zu einem Farbumschlag des Kulturmediums von Pink nach Gelb kommt. Die Intensität des Farbumschlags ist annähernd proportional zu der Menge der lebenden Zellen (vgl. Ergebnisse in Abbildung 21)

Auf Grund der toxischen Wirkung des Puromycins gegenüber eukaryotischen Zellen starben alle Zellen, welche nicht durch erfolgreiche Transduktion das Puromycinresistenz-Gen enthielten, innerhalb der nächsten drei Tage ab. So wurde die Transduktionsrate nach drei Tagen unter dem Mikroskop bestimmt und zur Ermittlung der geeigneten MOI herangezogen.

3.5 Austestung der benötigten Puromycinkonzentration

Die Zellen wurden zunächst wie unter 3.1 beschrieben gewaschen, trypsiniert und mit frischem Kulturmedium resuspendiert. Darauf folgte das Umsetzen der Zellen in fünf verschiedene Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:20 mit frischem Medium. Den Zellkulturflaschen wurde dann Puromycin in fünf verschiedene Konzentrationen laut Tabelle 5 zugesetzt.

Tabelle 5: Puromycinkonzentrationen zur Austestung

Zellkulturflasche	Puromycinkonzentration
Flasche 1	1 µg Puromycin pro ml Nährmedium
Flasche 2	2 µg Puromycin pro ml Nährmedium
Flasche 3	3 µg Puromycin pro ml Nährmedium
Flasche 4	4 µg Puromycin pro ml Nährmedium
Flasche 5	5 µg Puromycin pro ml Nährmedium

Nach sieben Tagen wurden die fünf Zellkulturen mikroskopiert und fotografiert, um die Anzahl der lebenden Zellen zu bestimmen. So sollte die Puromycinkonzentration ermittelt werden, bei welcher keine parentale Zelle mehr überlebt, aber transduzierten Zellkulturen mit Puromycinresistenz wachsen. Aus diesem Grund wurde die Austestung sowohl mit den parentalen als auch mit den transduzierten Zellkulturen einer Zelllinie durchgeführt und ausgewertet.

3.6 Transduktion mit Lentiviren

Da es innerhalb der Arbeitsgruppe noch keine Erfahrungen im Bereich der Transduktion mit den Lentiviren IE1 LV960 und IE2-1 LV1039 gab, war es Teil dieser Arbeit, eine Transduktionsmethode mit ausreichender Transduktionsrate zu etablieren. Zu diesem Zweck erfolgten die Transduktionen auf verschiedene Arten und mit unterschiedlichen Zellen (Übersicht dessen in Tabelle 6: Transduktionsmethoden). Bei allen Transduktionen dieser Arbeit wurde zu jeder

Transduktion parallel ein zweites Gefäß identisch behandelt, nur ohne viralen Überstand und dieses dann als Negativkontrolle (MOCK) ausgewertet.

Tabelle 6: Transduktionsmethoden

Transduktion	Methode	Inkubationszeit des lentiviralen Überstands	Zelllinien	Lentivirus	MOI
1	Transduktion adhärenter Zellen	3 Stunden unter Schwenken	UKF-NB-3 par.	IE1 LV960	5,59
				IE2-1 LV1039	0,94
			UKF-NB-4 par.	IE1 LV960	10,53
				IE2-1 LV1039	1,77
2	Transduktion in Zellsuspension	Wurde belassen	UKF-NB-3 par.	IE1 LV960	2
				IE2-1 LV1039	2
			U-251 MG par.	IE1 LV960	2
				IE2-1 LV1039	2
			HFF par.	IE1 LV960	2
				IE2-1 LV1039	2
3	Transduktion adhärenter Zellen	16 Stunden	UKF-NB-3 par.	IE1 LV960	4
				IE2-1 LV1039	4
			U-251 MG par.	IE1 LV960	2
				IE2-1 LV1039	4

			HFF par.	IE1 LV960	2
				IE2-1 LV1039	2
Referen z	Transduktion adhärenter Zellen	16 Stunden	U-251 MG par.	IE1 LV960	2

3.6.1 Transduktion 1

Die konfluenten Zellen (UKF-NB-3 par. und UKF-NB-4 par.) wurden wie unter 3.1 beschrieben gewaschen, trypsiniert und mit frischem supplementiertem IMDM (Kulturmedium) resuspendiert. Anschließend wurden sie im Verhältnis 1:4 mit frischem Kulturmedium in eine 25 cm²-Zellkulturflasche umgesetzt, dann für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert, um eine Zelldichte von 30% bis 50% zu erhalten. Dies wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und mit einem gleichbehandelten Kontrollgefäß wurde die Zellzahl bestimmt. Dann wurde das Kulturmedium der zu transduzierenden Zellen abgegossen und diese zweimal mit 1x PBS gewaschen. Der lentivirale Überstand wurde 1:4 mit Nährmedium verdünnt. Von dieser Lentiviren-Überstands-Lösung wurden 2 ml auf den gewaschenen Zellrasen appliziert. So wurde die Zellkulturflasche für drei Stunden in den Brutstand zur Inkubation verbracht und dabei alle fünfzehn Minuten geschwenkt. Im Anschluss wurde die Lentiviren-Überstands-Lösung abgegossen, der Zellrasen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Kulturmedium versorgt. Die so behandelten Zellen wurden drei Tage später mit 1 µg Puromycin pro 1 ml Kulturmedium versetzt. Drei weitere Tage später wurden die überlebenden Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und fotografiert.

3.6.2 Transduktion 2

Die konfluenten Zellen (UKF-NB-3 par., U-251 MG par. und HFF par.) wurden wie unter 3.1 beschrieben gewaschen, trypsiniert und mit frischem

supplementiertem IMDM (Kulturmedium) resuspendiert. Anschließend wurde im Verhältnis 1:3 die UKF-NB-3 par., 1:4 die U-251 MG par. und 1:1 die HFF par. mit frischem Kulturmedium eine Zellsuspension hergestellt. Von dieser wurde die Zellzahl bestimmt und die benötigte Menge zur Befüllung der MOCK-Flaschen entnommen. Mit der bestimmten Zellzahl wurde wie unter 3.3 beschrieben die benötigte Menge an lentiviralem Überstand bei einer MOI von 2 berechnet. Die berechnete Überstandsmenge wurde in die Zellsuspension gegeben, erst dann wurde diese in einzelne Kulturflaschen aufgeteilt. Die so transduzierten Zellen und MOCK-Zellen wurden bei 37°C gelagert und nach einem, drei und fünf Tagen abgestoppt. Es wurden zu den drei Zeitpunkten jeweils wie unter 3.8.6 beschrieben IE1- und IE2- Gene nachgewiesen und somit die Transduktionsrate bestimmt. Es wurden wie unter 3.8 beschrieben Proteine extrahiert.

3.6.3 Transduktion 3

Die konfluenten Zellen (UKF-NB-3 par., U-251 MG par. und HFF par.) wurden wie unter 3.1 beschrieben gewaschen, trypsinisiert und mit frischem supplementiertem IMDM (Kulturmedium) resuspendiert. Anschließend wurden die UKF-NB-3 par. im Verhältnis 1:4, die U-251 MG par. 1:5 und die HFF par. 1:1 mit frischem Kulturmedium in Zellkulturflaschen umgesetzt und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert, um eine Zelldichte von 30% bis 50% zu erhalten. Dies wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Mit einem Kontrollgefäß gleichen Volumens, welches gleich behandelt wurde, wurde nun die Zellzahl bestimmt. Mit dieser wurde die benötigte lentivirale Überstandsmenge wie unter 3.3 beschrieben berechnet. Es wurde dazu die MOI, wie in Tabelle 6 aufgeführt, für die verschiedenen Zellen und zwei Lentiviren festgelegt und zur Berechnung herangezogen. Die berechnete lentivirale Überstandsmenge wurde wenn nötig auf das in Tabelle 7 angegebene Volumen mit Kulturmedium ergänzt, dann auf den Zellrasen verbracht und dort bei 37°C für 16 Stunden belassen. Am Ende wurde der lentivirale Überstand abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium laut Tabelle 7 versehen. Die so transduzierten Zellen und MOCK-Zellen wurden bei 37°C gelagert und nach einem, drei, fünf

und sieben Tagen abgestoppt. Es wurden zu diesen Zeitpunkten jeweils wie unter 3.8.6 beschriebenen IE1- und IE2- Gene nachgewiesen und somit die Transduktionsraten bestimmt. Es wurden wie unter 3.8 beschrieben Proteine extrahiert.

3.6.4 Referenztransduktion

Die konfluenten U-251 MG par. Zellen wurden wie unter 3.1 beschrieben gewaschen, trypsiniert und mit frischem supplementiertem IMDM (Kulturmedium) resuspendiert. Anschließend wurden sie im Verhältnis 1:5 mit frischem Kulturmedium in Zellkulturflaschen oder auf Zellkulturplatten umgesetzt, dann mindestens 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert, um eine Zelldichte von 30% bis 50% zu erhalten. Dies wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Mit einem Kontrollgefäß gleichen Volumens, welches gleich behandelt wurde, wurde nun die Zellzahl bestimmt. Für die Transduktion mit den in dieser Arbeit verwendeten IE1 LV960 Lentiviren wurde nach Austestung der geeigneten MOI wie unter 3.4 beschrieben ein MOI von zwei festgelegt und beibehalten. Mit der ermittelten Zellzahl und der MOI von zwei wurde im Anschluss die benötigte lentivirale Überstandsmenge wie unter 3.3 aufgeführt berechnet. Nun wurde das Medium der Zellkulturen abgenommen und durch den errechneten, lentiviralen Überstand ersetzt. Dieser wurde wenn nötig mit frischem Kulturmedium auf das Volumen laut Tabelle 7 ergänzt. Daraufhin wurde die Zellkultur für 16 Stunden mit dem lentiviralen Überstand bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der lentivirale Überstand abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit 1x PBS gewaschen und schließlich mit frischem Kulturmedium laut Tabelle 7 ergänzt. Die so behandelten Zellen wurden zu festgelegten Zeitpunkten wie unter 3.8, 3.8.6 und 3.10 beschrieben weiter verwendet.

Tabelle 7: Volumina bei Referenztransduktion bzw. Infektion

Zellkulturgefäß	Volumen des Infektioser Überstand bei	Volumen des Kulturmediums
-----------------	---------------------------------------	---------------------------

	Transduktion/ Infektion	
Deckgläschen in Petrischale	600 µl	5 ml
12-Loch-Zellkulturplatte	1 ml	1 ml
12,5 cm ² -Zellkulturflasche	1 ml	5 ml
25 cm ² -Zellkulturflasche	2 ml	10 ml

3.7 Infektion mit HCMV

Die Infektion mit HCMV-Hi91 erfolgte analog zur Transduktion mit Lentiviren. Es wurde auch mit einer MOI von zwei gearbeitet, die Volumina wurden auch wie in Tabelle 7 beschrieben verwendet, und es wurde auch zu jeder Infektion eine MOCK-Probe geführt. Der Ablauf der Infektion unterschied sich lediglich in zwei Punkten: Der erste war die Verwendung von supplementiertem IMDM zur Infektion statt des supplementiertem IMDM der Zellkultur, welches sich in der FCS-Konzentration unterschied. Grund hierfür ist die toxische Wirkung des FCS auf HCMV. Den zweiten Punkt stellte die Inkubationszeit mit infektiösem Überstand dar, der Zellrasen wurde bei der Infektion mit HCMV nur eine Stunde mit viralem Überstand bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium zur Infektion laut Tabelle 7 ergänzt.

3.8 Western Blot

3.8.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte durch Zellyse. Alle Arbeiten wurden dabei auf Eis durchgeführt, und alle Lösungen wurden auf +4°C heruntergekühlt. Es wurden für diese Arbeit standardmäßig die Proteine aus einer 25 cm²-Zellkulturflasche mit konfluentem Zellrasen gewonnen. Nach Abgießen des Kulturmediums wurde der Zellrasen zweimal mit 4°C 1x PBS gewaschen und zehn Minuten auf Eis mit 350 µl Lysepuffer inkubiert. Nach dem Lysevorgang wurden noch anheftende Zelltrümmer mechanisch durch Abspülen von der

Kulturflaschenoberfläche gelöst. Die entstandene Suspension wurde in eine Cyro-Tube überführt und eine Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert, oder sofort weiter verwendet zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration. Das Pellet wurde verworfen.

3.8.2 Bestimmung und Einstellung der Gesamtproteinkonzentration

Die Einstellung erfolgte mit einem Protein Assay Kit, dem DC Protein Assay Reagens der Firma Bio-Rad Laboratories. Der Assay basierte auf einer modifizierten Methode von Lowry et al. von 1951 und erfolgte in zwei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt kam es zu einer Komplexbildung zwischen den Kupfer(II)-Ionen einer basischen Kupfertartrat-Lösung und den Peptidbindungen der in der Probe befindlichen Proteine. Im zweiten Schritt wurden zunächst Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Diese reduzierten Kupfer(I)-Ionen reduzierten dann das gelbe Folin-Ciocalteau-Reagenz zu Molybdänblau. Die Intensität der daraus resultierenden Blaufärbung war annähernd proportional zu der gelösten Proteinmenge der Probe und konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt werden. Dabei galt: Je intensiver die Blaufärbung, umso höher der Proteingehalt der Probe.

Die Analyse wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte im Dreifachansatz durchgeführt. Als Standard dienten BSA-Lösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen von 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 und 2,5 mg/ml. Im ersten Schritt wurden je 5 µl der Probe und der Referenzlösungen vorgelegt. Als nächstes wurden 25 µl pro Loch von A'-Mix hinzugefügt. Dieser Mix besteht aus einer Mischung von 1 ml Reagenz A (= Kupfertartrat-Lösung) und 20 µl Reagenz S (= Surfactant-Lösung). Darauf folgten 200 µl pro Loch von Reagenz B (= Folin-Ciocalteau-Reagenz). Nach fünfzehnminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung der Absorption. Die ermittelten Werte wurden in Excel weiter verwendet. Dabei wurde mittels linearer Regression basierend auf den Werten der Standardreihe die Formel zur

Umrechnung der jeweiligen Absorptionswerte in die Proteinkonzentrationen (mg/ml) bestimmt. Nach Errechnung aller Proteinkonzentrationen der zu vergleichenden Proben wurden diese mit Triton-X-Lysepuffer alle auf die Konzentration der Probe mit dem niedrigsten Proteingehalt verdünnt. Am Ende wurden alle Proben mit Probenpuffer 1:1 versetzt und bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Die so eingestellten Proben wurden entweder direkt weiter verwendet für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder bei -20°C gelagert.

3.8.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (= SDS-PAGE)

Mittels der SDS-PAGE wurden die Proteine der Proben nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt. Dazu wurden die Proteine zunächst durch Erhitzen mit SDS und β -Mercaptoethanol-haltigem Probenpuffer denaturiert und somit um ihre Quartärstruktur gebracht. SDS zerlegte dabei die Proteine in Untereinheiten, und das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol spaltete verbleibende Disulfidbrücken. Darüber hinaus wurde die endogene Ladung der Polypeptidketten durch die zahlreich angelagerten SDS-Moleküle überdeckt (s. Abbildung 15).

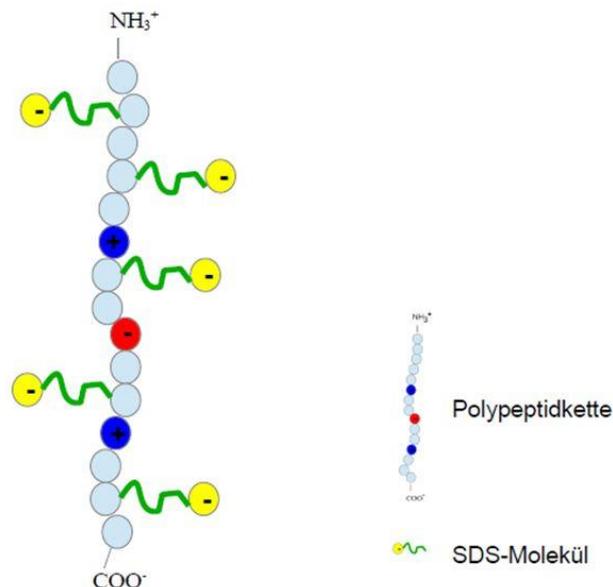


Abbildung 15: Einführung negativer Ladungen durch SDS

Es entstanden stark negativ geladene Protein-SDS-Komplexe mit nahezu gleichem Ladungs/Masse-Verhältnis, die alle zur Anode beschleunigt wurden.

Das Polyacrylamidgel bremste diese Beschleunigung in Abhängigkeit zur Proteinmasse. So wanderten kleine Moleküle schneller und damit weiter im Gel-Block als größere Moleküle. In der vorliegenden Arbeit wurde in Abhängigkeit von der Proteingröße ein zwölfprozentiges oder fünfzehnprozentiges, basisches Polyacrylamidgel als Trenngel verwendet: Zwölfprozentiges für Proteine größer als 20 kDa und fünfzehnprozentiges für kleinere Proteine. Das verwendete Sammelgel mit Auftrageschichten hatte immer eine fünfprozentige Acrylamid-Konzentration. Nach Einspannen der Gele in die Elektrophoresemodule wurden diese mit Laufpuffer befüllt. Von den eingestellten Proben wurden je 15 µl aufgetragen, von dem Proteinstandard 5 µl. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der Proteine bei einer konstanten Spannung von 120 V für 60 - 90 Minuten.

3.8.4 Protein-Transfer (Western Blot)

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Diese und auch das Filterpapier wurden zunächst auf die Größe von 6 x 9 cm zugeschnitten und mit Transferpuffer getränkt. Die Glaskammer des Polyacrylamidgels wurde vorsichtig in einer Wanne mit Aqua dest. geöffnet. Dann wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. In einer zweiten Wanne wurde die Blot-Kassette mit Filterwolle (= Fiber Pad), Filterpapier, Nitrocellulosemembran und Polyacrylamidgel bestückt. Diese Anordnung ist der Abbildung 16 zu entnehmen.

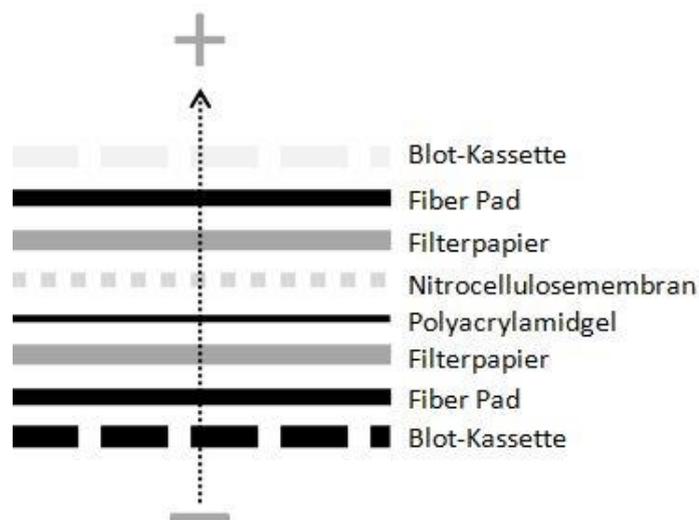


Abbildung 16: Bestückung der Blot-Kassette

Es wurde sorgfältig darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Gel und Nitrocellulosemembran befanden. Die bestückte Blot-Kassette wurde in eine Blotkammer überführt, welche mit einem Kühlelement und Transferpuffer befüllt wurde. Durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 500 mA für eine Stunde wurden die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode bewegt und somit vom Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

3.8.5 Immunhistochemischer Proteinnachweis

Nach erfolgtem Protein-Transfer wurde die Nitrocellulosemembran in ein lichtundurchlässiges Zentrifugen-Röhrchen mit 50 ml Volumen überführt. Alle Inkubationsschritte fanden darin auf einem Rollmischer statt. Zu Beginn wurden zunächst durch vierzigminütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Blockingpuffer freie, unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran gesättigt. In Abhängigkeit zum ersten Antikörper wurde zwischen Milch- oder BSA-Blockingpuffer unterschieden (s. Tabelle 8). Als nächster Schritt folgte die Inkubation über Nacht und bei 4°C mit dem verdünnten Primärantikörper. Der verwendete Verdünnungspuffer der Primärantikörper-Lösung ist in der Tabelle 8 ersichtlich. Am nächsten Morgen wurde nach Abkippen der Primärantikörper-Lösung drei Mal á zehn Minuten mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die Primärantikörper-Lösung wurde aufgefangen und zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Als nächstes wurde die Sekundärantikörper-Lösung frisch hergestellt durch Verdünnung mit BSA-Blockingpuffer. Diese Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte wie beschrieben. Die Konjugation der Sekundärantikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen ermöglichte die Detektion der gesuchten Proteine an einem Infrarotscanner. Mit dessen Software wurden die Proteine auch quantitativ bestimmt.

Tabelle 8: Verfahren mit Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Verdünnungspuffer	Blockingpuffer
-------------------	-------------------	--------------------------	-----------------------

B-Actin	1:5000	1x PBS	BSA-Blockingpuffer
PRSS7	1:500	1x PBS	BSA-Blockingpuffer
IE1	1:1000	BSA-Blockingpuffer	Milch-Blockingpuffer
IE2	1:1000 (WB)	BSA-Blockingpuffer	Milch-Blockingpuffer

3.8.6 Bestimmung der relativen Proteinmenge nach Quantifizierung

Die mit fluoreszierenden, sekundären Antikörper behandelten Nitrocellulosemembranen (vgl. 3.8.5) wurden mittels eines Infrarotscanners gescannt. Mit der Bildsoftware des Scanners wurden die Farbintensitäten der WB-Banden detektiert und gemessen. Wir haben die gemessene Farbintensität als absolute Proteinmenge definiert um dann, wie folgt, die quantitative Proteinmenge zu errechnen:

Dabei sei M_p^{xn} die gemessene absolute Menge von Protein p in den nach Verfahren x behandelten U-251-MG-Zellen n Tage nach Behandlung. Dabei ist p entweder IE1, β -Actin oder Entero(kinase); x ist entweder t für „Transduktion“ oder i für „Infektion“. Analog definieren wir \hat{M}_p^{xn} als die entsprechende Proteinmenge in den jeweils parallel geführten MOCK-Zellen. Wir definieren weiterhin die relative Proteinmenge

$$\tilde{n}_p^{xn} := \frac{M_p^{xn}}{M_{\hat{\alpha}\text{-Actin}}^{xn}}$$

bzw.

$$\tilde{\tilde{n}}_p^{xn} := \frac{\hat{M}_p^{xn}}{\hat{M}_{\hat{\alpha}\text{-Actin}}^{xn}}$$

Die ermittelte absolute Proteinmenge von IE1 1d post transduction (1d p.t.) in transduzierten Zellen sei somit M_{IE1}^{t1} , die von β -Actin $M_{\hat{\alpha}\text{-Actin}}^{t1}$ und die von Entero kinase M_{Entero}^{t1} . Die ermittelte absolute Proteinmenge von IE1 1d p.t. in MOCK- Zellen sei somit \hat{M}_{IE1}^{t1} , die von β -Actin $\hat{M}_{\hat{\alpha}\text{-Actin}}^{t1}$ und die von Entero kinase \hat{M}_{Entero}^{t1} . Die ermittelte absolute Proteinmenge von IE1 1d post infectionem (1d p.i.) in infizierten Zellen sei somit M_{IE1}^{i1} , die von β -Actin $M_{\hat{\alpha}\text{-Actin}}^{i1}$

und die von Enterokinase M_{Entero}^{i1} . Die ermittelte absolute Proteinmenge von IE1 1d p.i. in MOCK- Zellen sei somit \tilde{M}_{IE1}^{i1} , die von β -Actin $\tilde{M}_{\beta-Actin}^{i1}$ und die von Enterokinase \tilde{M}_{Entero}^{i1} .

Somit wurde die relative Proteinmenge von IE1 in behandelten U-251 MG wie folgt bestimmt: $\tilde{n}_{IE1}^{xn} = \frac{M_{IE1}^{xn}}{M_{\beta-Actin}^{xn}}$ und die relative Proteinmenge von Enterokinase

in behandelten U-251 MG: $\tilde{n}_{Entero}^{xn} = \frac{M_{Entero}^{xn}}{M_{\beta-Actin}^{xn}}$. Äquivalent galt für die

Bestimmung der relativen Proteinmengen von IE1 und Enterokinase in MOCK-Zellen: $\tilde{n}_{IE1}^{xn} = \frac{\tilde{M}_{IE1}^{xn}}{\tilde{M}_{\beta-Actin}^{xn}}$ und $\tilde{n}_{Entero}^{xn} = \frac{\tilde{M}_{Entero}^{xn}}{\tilde{M}_{\beta-Actin}^{xn}}$.

3.9 Labelled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB)

Die LSAB wurde verwendet um die intrazellulären Proteine IE1 und IE2 zu detektieren, welche bei dieser Methode die Antigene darstellten. Die LSAB basiert auf der Redoxreaktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Substrat und 3-Amin-5-Ethylcarbazol (AEC) als Chromogen, wodurch es zu einer Rotfärbung des AECs kommt. Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 17 dargestellt.

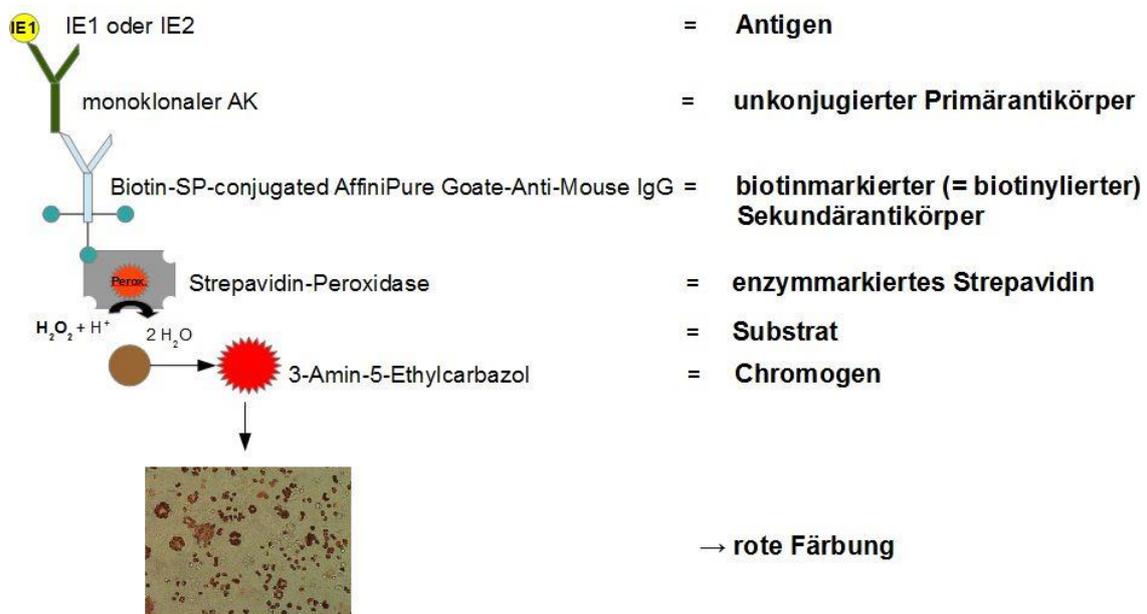


Abbildung 17: Labelled Streptavidin-Biotin-Methode

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Methode stets in 12,5 cm²-Zellkulturflaschen durchgeführt. Dazu wurde zum untersuchenden Zeitpunkt der Zellrasen in der

Zellkulturflasche fixiert. Zunächst musste hierfür das Kulturmedium abgesaugt werden, um dann durch fünfzehnminütige Inkubation mit 3 ml auf -20°C gekühltem Aceton/Methanol-Gemisch die Zellen an der Zellkulturflaschen-Oberfläche zu fixieren. Nach Abgießen und Abklopfen des Aceton/Methanol-Gemisches wurde dieses durch 2 ml Blocking Solution ersetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. An dieser Stelle wurde bei manchen Versuchsabläufen die Probe mit der Blocking Solution mehrere Tage im Kühlschrank gelagert, um später mit der Methode fortzufahren. Die Blocking Solution wurde abgegossen und abgeklopft und durch 1,5 ml Primärantikörper-Lösung ersetzt. Diese wurde für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Abgießen und Abklopfen der Primärantikörper-Lösung wurde die Probe dreimal mit 3 ml Waschpuffer gespült. Waschpufferreste wurde auf einem Papiertuch abgeklopft und durch 1,5 ml Lösung des biotinmarkierten Sekundärantikörpers ersetzt. Es folgte wieder eine 30-minütige Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurde die Lösung des biotinmarkierten Sekundärantikörpers abgegossen, auf einem Papiertuch abgeklopft und nach dreimaligem Waschen mit 3 ml Waschpuffer durch 1,5 ml Streptavidin-Peroxidase-Lösung ersetzt. Diese inkubierte für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank um dann abgegossen, abgeklopft und durch dreimaliges Abwaschen mit 3 ml Waschpuffer entfernt zu werden. Nach Auftragen der 1,5 ml AEC-Substrat-Lösung wurde die Probe für ca. fünf bis zehn Minuten in den Brutschrank verbracht. Das Ende dieser Inkubationszeit wurde von einer optischen Kontrolle der Farbreaktion abhängig gemacht. Bei ausreichend kräftiger Rotfärbung, was bedeutete, dass die Farbreaktion von Farblos nach Rot des Chromogens AEC makroskopisch erkennbar war, wurde die AEC-Substrat-Lösung abgenommen, zweimal abgewaschen und durch 2 ml Waschpuffer ersetzt. Mit dem Waschpuffer auf der Probe konnte diese im Kühlschrank für einige Tage gelagert werden, oder sofort zu Auswertungszwecken unter dem Lichtmikroskop fotografiert werden (s. **Abbildung 18**[Error! Reference source not found.](#)).

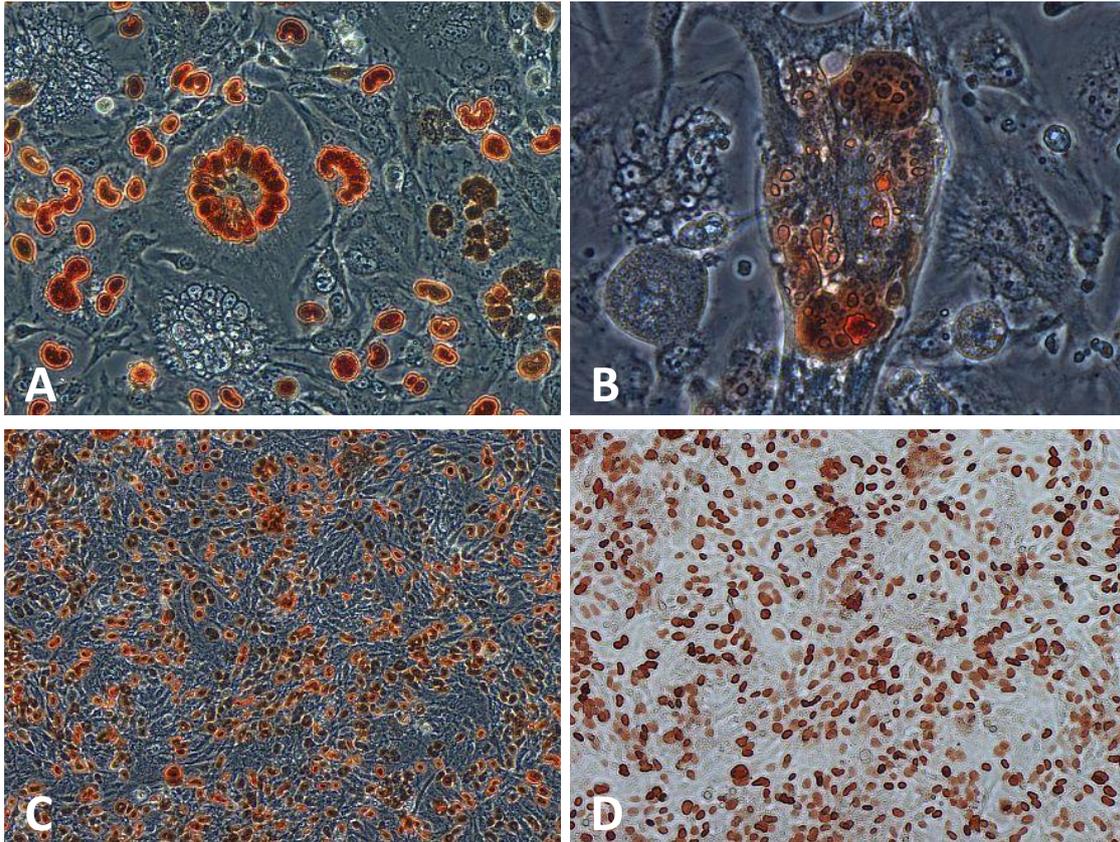


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen der durch LSAB gefärbten IE1-Proteine in U-251 MG: **A** 200fache Vergrößerung 3d nach HCMV-Hi91 Infektion; **B** 400fache Vergrößerung einer mehrkernigen Zelle 3d nach HCMV-Hi91 Infektion; **C** 100fache Vergrößerung 3d nach IE1-Transduktion; **D** Bildausschnitt wie in C jedoch unter Farbfilttereinsatz

3.10 Immunfluoreszenzfärbung (IF-Färbung)

Bei der IF-Färbung handelt es sich ebenfalls um eine immunhistochemische Methode. Hier ist der Sekundärantikörper jedoch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. In dieser Arbeit diente die Methode zur Detektion der IE-Proteine und der Enterokinase. Die konfluenten Zellen wurden wie unter 3.1 beschrieben gewaschen, trypsinisiert und mit frischem supplementiertem IMDM (Kulturmedium) resuspendiert. Anschließend wurden 1.400 µl der Zellsuspension auf ein steriles Deckglaschen, welches sich in einer sterilen Petrischale befand, pipettiert und für zwei Stunden bei 37°C im CO₂-Brutschrank (5% CO₂) kultiviert. Darauf folgte, nach positiver Adhärenzkontrolle unter dem Mikroskop, die Zugabe von 5.600 µl frischem Medium in die Petrischale, dann wurden die Zellen mindestens 24 Stunden bei 37°C im CO₂-Brutschrank kultiviert um eine Zelldichte von 30% bis 50% zu erhalten. Dies

wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Mit einem Kontrollgefäß gleichen Volumens, welches gleich behandelt wurde, wurde nun die Zellzahl bestimmt.

Für die Transduktion wurde mit der ermittelten Zellzahl und der MOI von zwei im Anschluss die benötigte lentivirale Überstandsmenge wie unter 3.3 aufgeführt berechnet. Nun wurde das Medium der Zellkulturen vorsichtig abgenommen und durch den errechneten lentiviralen Überstand ersetzt. Dieser wurde wenn nötig mit frischem Kulturmedium auf das Volumen laut Tabelle 7 ergänzt. Daraufhin wurde die Zellkultur für 16 Stunden mit dem lentiviralen Überstand bei 37°C im CO₂ –Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der lentivirale Überstand abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit 1x PBS gewaschen und schließlich mit frischem Kulturmedium laut Tabelle 7 ergänzt. Die so behandelten Zellen wurden zu festgelegten Zeitpunkten wie unten beschrieben weiter verwendet.

Die Infektion mit HCMV-Hi91 erfolgte analog zur Transduktion mit Lentiviren. Es wurde auch mit einer MOI von zwei gearbeitet, die Volumina wurden auch wie in Tabelle 7 beschrieben verwendet, und es wurde auch zu jeder Infektion eine MOCK-Probe geführt. Der Ablauf der Infektion unterschied sich lediglich in zwei Punkten: Der erste war die Verwendung von supplementiertem IMDM zur Infektion statt des supplementierten IMDM der Zellkultur, welches sich in der FCS-Konzentration unterschied. Den zweiten Punkt stellte die Inkubationszeit mit infektiösem Überstand dar, der Zellrasen wurde bei der Infektion nur eine Stunde mit dem Vollvirus bei 37°C im CO₂ –Brutschrank inkubiert. Dann wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen, mit frischem Kulturmedium zur Infektion laut Tabelle 7 ergänzt und zu festgelegten Zeitpunkten wie im nächsten Absatz beschrieben weiter verwendet.

Zunächst erfolgte die Präfixation der transduzierten bzw. infizierten Zellen durch Zugabe von 2,5 ml Formaldehyd-Lösung 3,7% direkt in das Kulturmedium und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Medium-Formalin-Gemisches wurde dieses durch 5 ml Formaldehyd-Lösung 3,7% zur Fixation ersetzt. Es wurde darauf geachtet, die Lösung bei Applikation nicht direkt auf den Zellrasen zu pipettieren. Die Formaldehyd-Lösung wurde bei Raumtemperatur für zehn Minuten auf den Zellen belassen. Nach Absaugen

der Lösung folgte ein zweimaliges vorsichtiges Waschen der Zellen mit 1x PBS. Um ein besseres Ergebnis mit weniger störendem Hintergrundrauschen bei der abschließenden Fotografie zu erzielen, wurde in der Arbeitsgruppe die Erfahrung gemacht, dass nach Fixation der Zellen diese mindestens 4 Tage in Waschpuffer zu lagern sind. Dazu wurde der Zellrasen nach dem Waschen mit 1x PBS mit 5 ml Waschpuffer bedeckt und die geschlossene Petrischale für mindestens 4 Tage in den Kühlschrank verbracht. Im Anschluss an diese Lagerung und Absaugen des Waschpuffers wurde dieser durch 5 ml Blockingpuffer ersetzt. Es folgten 45 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur und in Dunkelheit. Daraufhin wurde das Deckglaschen mit dem Zellrasen aus der Petrischale auf die Färbvorrichtung überführt. Die Färbvorrichtung bestand aus zwei Teilen: Dem unteren Teil, welcher aus dem Boden einer Petrischale bestand, in welchem der Plastikdeckel eines Zentrifugen-Röhrchens geklebt wurde (s. Abbildung 19). Der obere Teil wurde durch den Deckel der Petrischale gebildet, in welchem ein befestigtes, mit Reinstwasser getränktes Zellulosetuch angebracht war. Die Färbvorrichtung wurde während der Inkubationszeiten verschlossen, um die Proben vor dem Austrocknen zu bewahren.



Abbildung 19: Unterer Teil der Färbvorrichtung; aufliegende Deckgläschen mit Zellrasen beschickt mit 500 µl Primärantikörperlösung

Als nächster Schritt wurden 500 µl Primärantikörperlösung auf das Deckglas pipettiert, gefolgt von einer einstündigen Inkubationszeit in Dunkelheit und bei Raumtemperatur. Danach wurde das Deckglas einer Petrischale zweimal mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen. Wieder zurück auf der Färbvorrichtung wurde das Deckglas mit 500 µl Sekundärantikörperlösung beschickt und wieder eine Stunde in Dunkelheit und bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten wieder zwei Waschvorgänge in der Petrischale. Letztlich wurde eine Kontrollfärbung der DNA in den Zellkernen mit DAPI-Lösung vorgenommen, wozu das Deckglas auf der Färbvorrichtung mit 500 µl dieser Lösung getränkt wurde. Die folgende fünfzehnminütige Inkubationszeit im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde durch zweimaliges Waschen beendet. Das Deckglas wurde zur sofortigen Fotografie unter einem Fluoreszenzmikroskop in 5 ml PBS in der Petrischale gelagert.

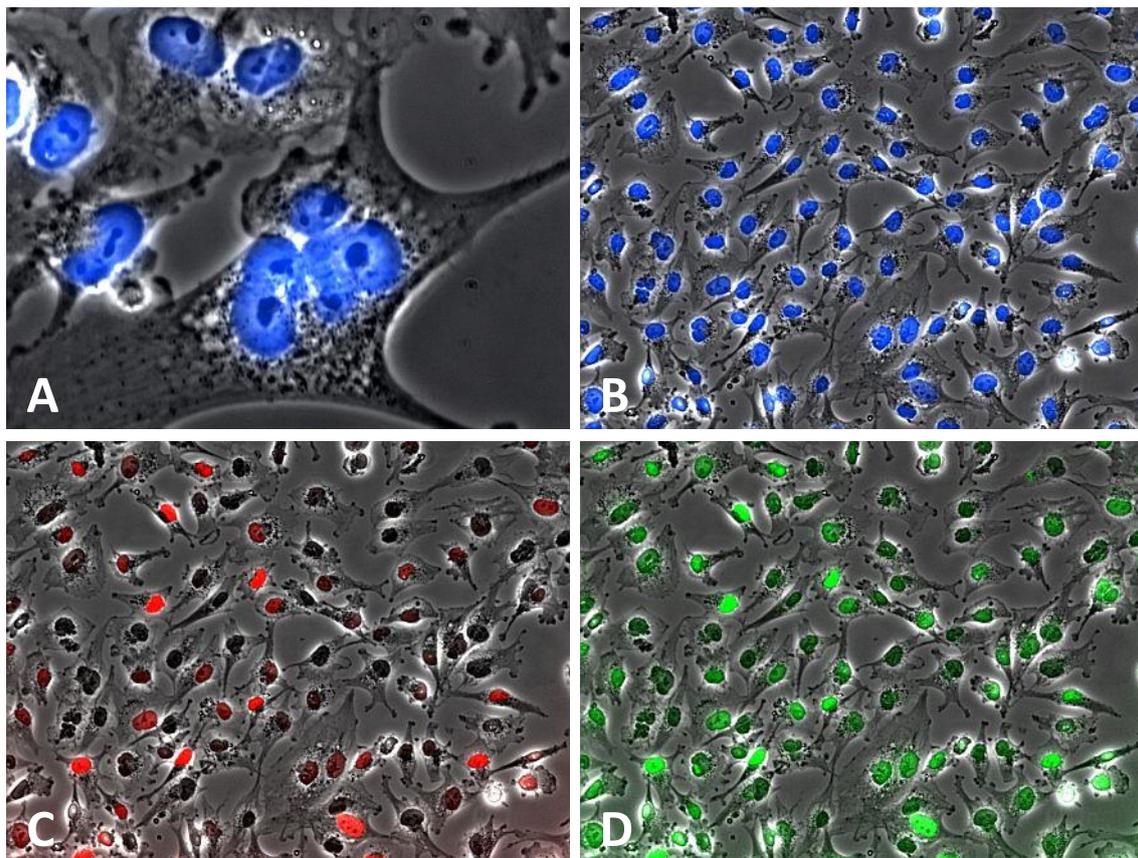


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach IF-Färbung von U-251 MG:

A 400fache Vergrößerung der Kontrollfärbung mit DAPI am Tag 1 nach IE1-Transduktion; **B** 200fache Vergrößerung der Kontrollfärbung mit DAPI am Tag 1 nach IE1-Transduktion; **C** 200fache Vergrößerung der Färbung (rot) auf IE1-Proteine am Tag 1 nach IE1-Transduktion; **D** 200fache Vergrößerung der Färbung (grün) auf Enterokinase am Tag 1 nach IE1-Transduktion

4 Ergebnisse

4.1 Erarbeitung eines zuverlässigen Protokolls zur Transduktion mit lentiviralen IE1- und IE2-Konstrukten

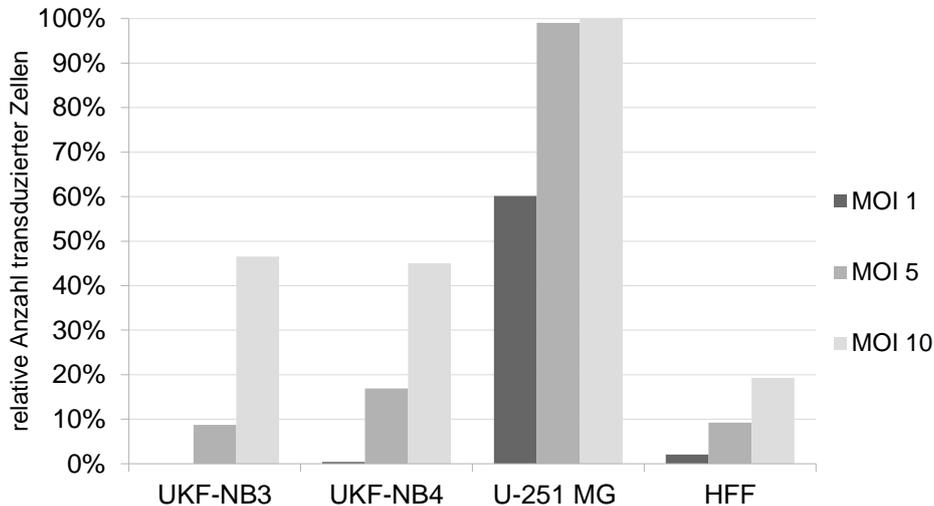
Um ein effizientes, zuverlässiges Protokoll zur Herstellung einer IE1- und einer IE2-exprimierenden Tumorzelllinien mit Hilfe von lentiviralem Gentransfer zu erstellen, stand zu Beginn die Charakterisierung des Permissivitätsgrades und die Bestimmung der bestmöglichen Transduktionsmethode von Tumorzellen im Vordergrund. Es wurden zwei Neuroblastom-Zelllinien und eine Glioblastomzelllinie als onkologische Modelle gegeneinander getestet. Man entschied sich für diese Zelllinien, da an Neuroblastomzellen bereits von Cinatl jr. et al. der Effekt der Onkomodulation durch HCMV gezeigt und erforscht wurde. Glioblastomzellen dagegen erschienen als sinnvoll, da sie permissiv für HCMV sind (vgl. 1.1.6). Des Weiteren fand man *in vivo* in Glioblastomen HCMV und im umliegenden Gewebe nicht (vgl. 1.3). Dies deutet darauf hin, dass dieser Tumor eine genetische Ausstattung bereithält, welche eine persistente Infektion ermöglicht. Als primäre Zelllinie dienten Vorhautfibroblasten, da sie zu den primären Zielzellen einer HCMV-Infektion zählen (vgl. 1.1.6).

4.1.1 Austestung der geeigneten MOI

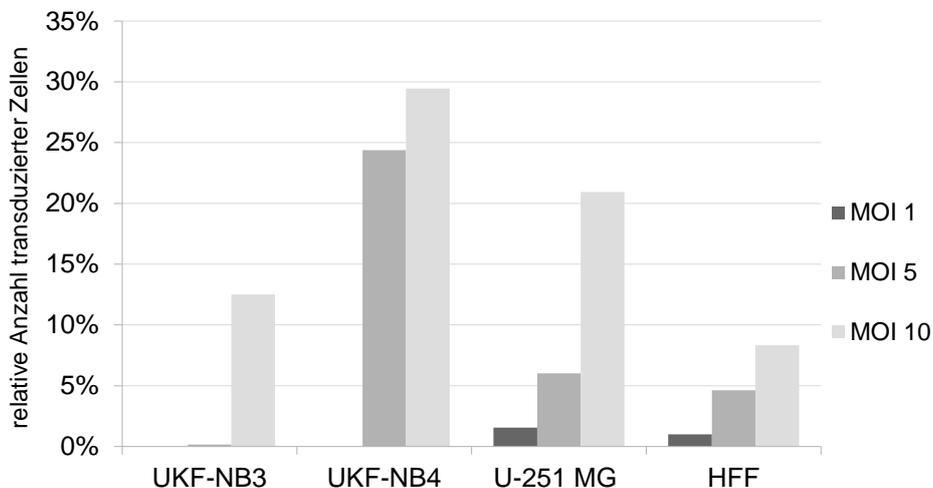
Die vier Zelllinien wurden 30%-50% konfluent in 12-Well-Platten kultiviert und mit lentiviralem Überstand entsprechend dem zu testenden MOI (1, 5 und 10) für drei Tage bei 37°C transduziert. Nach Waschen mit PBS wurde frisches Medium und Puromycin 1 µg/ml zugefügt. Nach weiteren drei Tagen wurde der Anteil der noch vitalen Zellen mikroskopisch bestimmt (vgl. 3.4). Die nach Puromycinbehandlung vitalen Zellen an Tag 6 post transduction (p.t.) wurden als transduzierte Zellen gerechnet.

Es zeigten sich deutliche quantitative Unterschiede zwischen den Zelllinien, aber auch zwischen den Konstrukten. Unter allen MOI und bei beiden Konstrukten zeigte sich die Glioblastomzelllinie U-251 MG als permissiver als die restlichen drei Zelllinien (s. Abbildung 21; Abbildung 22). Bei allen Zelllinien

konnte eine geringere Transduktionsrate mit dem Konstrukt IE2-1 LV1093 gegenüber dem Konstrukt IE1 LV963 beobachtet werden (s. Abbildung 21; Abbildung 22).



*Abbildung 21: MOI-Austestung mit Konstrukt IE1 LV963
Relative Anzahl der vitalen Zellen nach Puromycinbehandlung an 6d p.t.*



*Abbildung 22: MOI-Austestung mit Konstrukt IE2-1 LV1093
Relative Anzahl der vitalen Zellen nach Puromycin-Behandlung an 6d p.t.*

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse (s. Abbildung 21; Abbildung 22) und der begrenzt vorhandenen Menge an Konstrukten wurden die optimalen MOI wie in Tabelle 9 aufgeführt festgelegt. Auch wurde entschieden, auf Grund ihrer Eigenschaften wie z.B. Adhäsions- und Wachstumsverhalten, nicht mehr weiter mit UKF-NB-4 zu arbeiten. Ein MOI 2 für IE1-Transduktion und ein MOI 4 für

IE2-Transduktion von U-251 MG-Zellen erschien am sinnvollsten und erwies sich bei folgenden Transduktionen (vgl. 4.2 und 4.3) als effizient.

Tabelle 9: Festgelegte MOI

Zelllinie	Konstrukt	Festgelegter MOI
UKF-NB-3 par.	IE1 LV960	4
	IE2-1 LV1039	4
U-251 MG par.	IE1 LV960	2
	IE2-1 LV1039	4
HFF par.	IE1 LV960	2
	IE2-1 LV1039	2

4.1.2 Transduktionsmethoden

Es sollten die Transduktionsraten von adhären transduzierten (vgl.3.6.3) gegen in Suspension transduzierten Zellen (vgl. 3.6.2) verglichen werden. Als transduzierte Zellen wurden alle in der SLAB auf IE1 bzw. IE2 positiven Zellen gezählt. Dazu wurden zum einen die Zellen nach Protokoll (vgl. 3.1.1) umgesetzt, wobei die Zellzahl bestimmt (vgl. 3.2), die frisch transferierte Zellsuspension mit Lentivirus-Überstand beimpft und an Tag 1, 3 und 5 p.t. abgestoppt wurde. Im Vergleich dazu wurde das Medium von 30 - 50% konfluenten Zellen abgegossen und durch lentiviralen Überstand ersetzt. Dann wurde bei dieser Versuchsreihe nach 16 h Inkubation der lentivirale Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen. Auch hier wurde an Tag 1, 3 und 5 p.t. abgestoppt. Bei beiden Versuchsreihen wurde mittels der SLAB die relative Anzahl der IE1- und IE2-exprimierenden Zellkerne bestimmt.

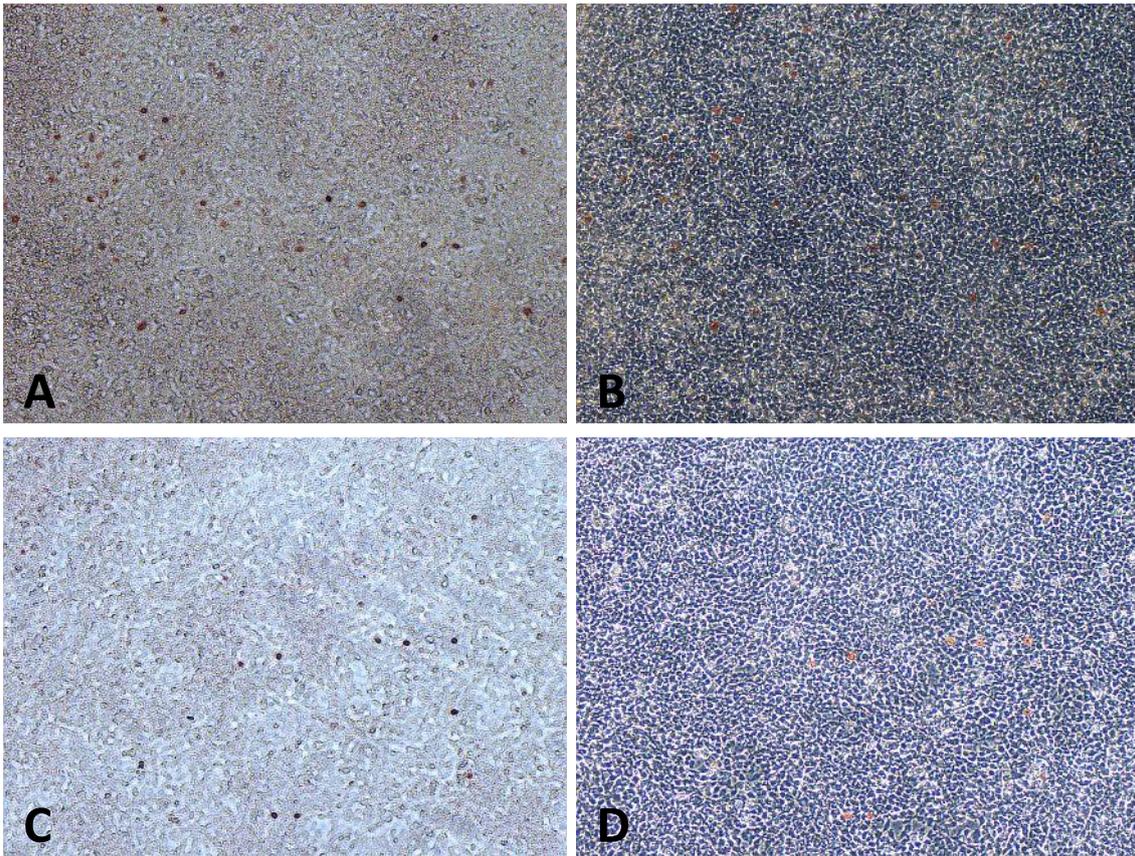


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahmen (10x) einer Immediate Early-1-Färbung (SLAB) bei UKF-NB-3 an 5d p.t.:

***A,B** Transduktion adhärenter Zellen; **C,D** Transduktion in Suspension*

Bei der Zelllinie UKF-NB-3 zeigten sich bei der Transduktion in Suspension bei beiden Konstrukten so niedrige Transduktionsraten ($< 0,001\%$) dass eine quantitative Auswertung nicht möglich war (s. Abbildung 23).

Bei den HFF konnten für beide Konstrukte bei adhärenter Transduktion im Vergleich zur Transduktion in Suspension höhere Transduktionsraten erzielt werden (s. Abbildung 23, Abbildung 24). Auch hier wurde auf Grund zu niedriger Transduktionsraten ($<0,001\%$) auf eine quantitative Auswertung der IE2-Konstrukte verzichtet (s. Abbildung 24).

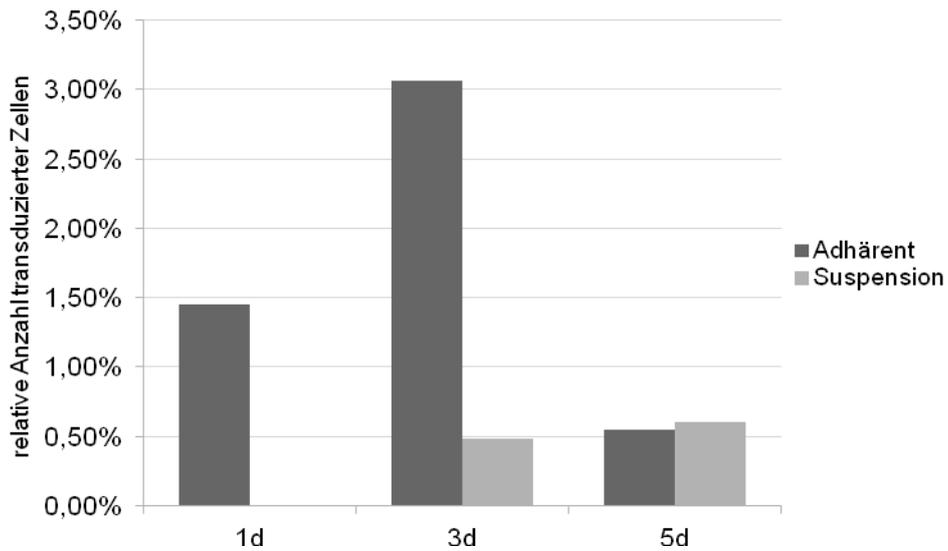


Abbildung 24: IE1-Antigen-Expression in HFF-Zellen bestimmt mit SLAB

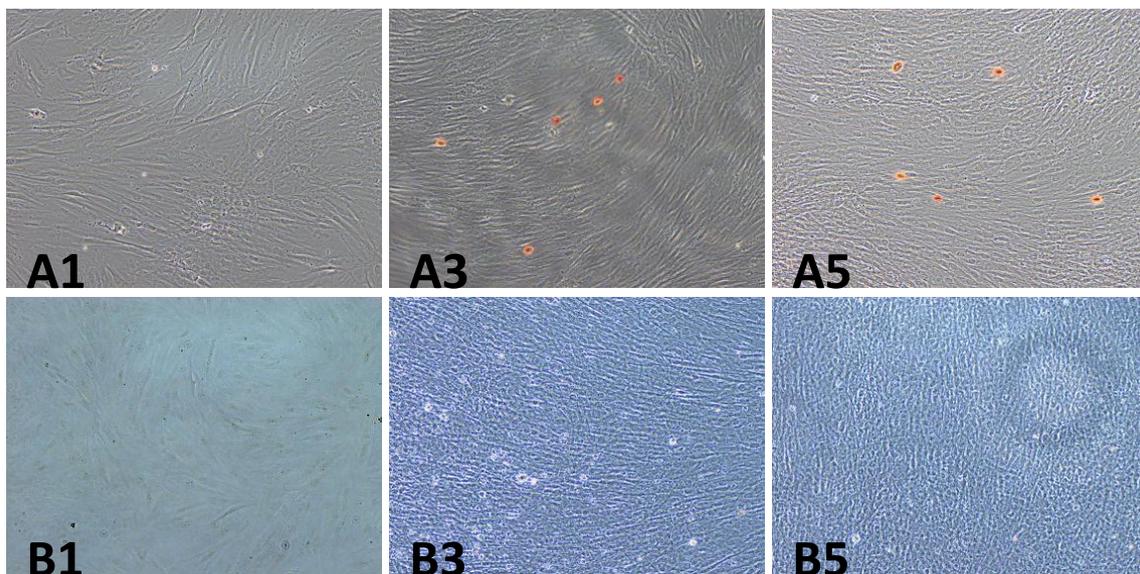


Abbildung 25: Lichtmikroskopische Aufnahme (10x) von HFF nach SLAB:
A Transduktion mit IE2 von adherenter Zellen an Tag 1,3 und 5 p.t.; **B**
 Transduktion mit IE2 in Suspension an Tag 1,3 und 5 p.t.

Bei den Glioblastomzellen zeigte sich bei beiden Konstrukten die Transduktion von adhärennten Zellen als effektiver (s. Abbildung 26; Abbildung 27).

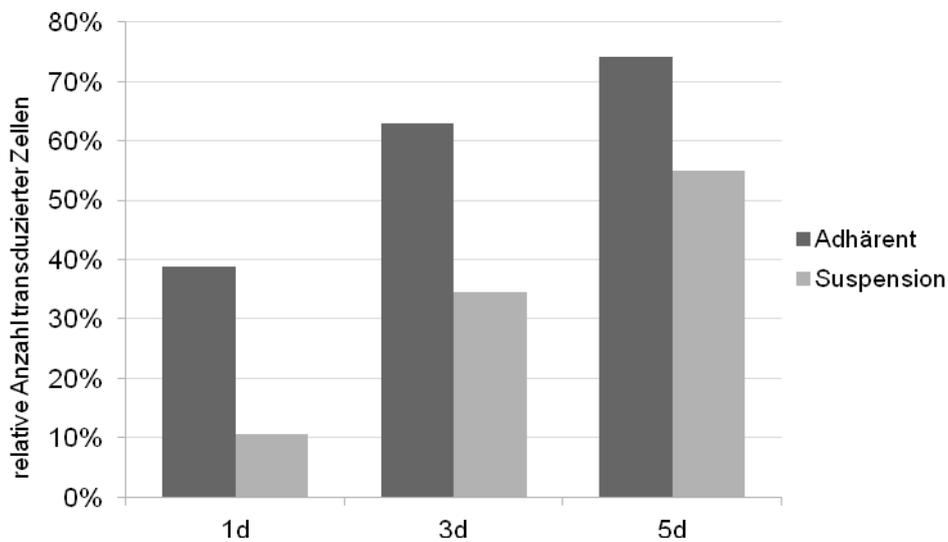


Abbildung 26: IE1-Antigen-Expression in U-251 MG Zellen bestimmt mit SLAB

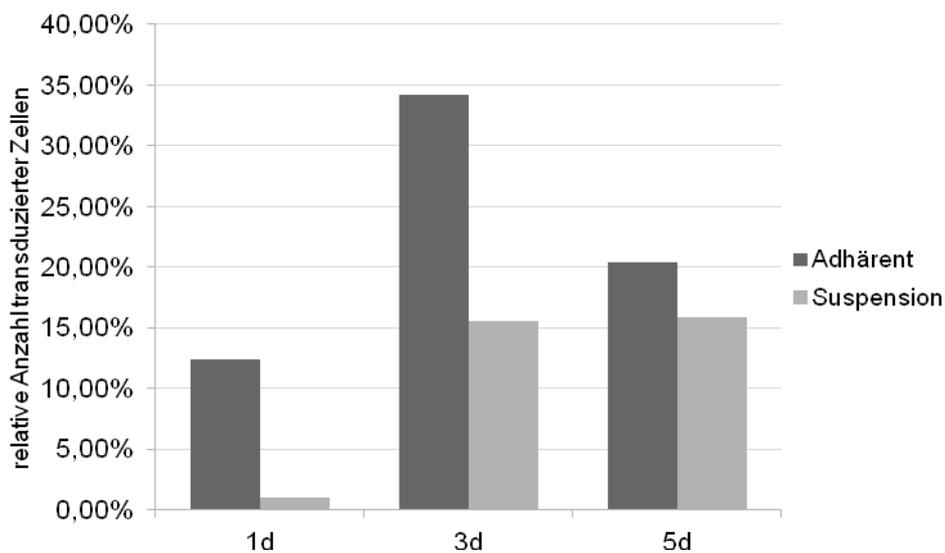


Abbildung 27: IE2-Antigen-Expression in U-251 MG Zellen bestimmt mit SLAB

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Zelllinien UKF-NB-3, HFF und U-251 MG die Transduktion in Zellsuspension keine höheren Transduktionsraten im Vergleich zur Transduktion adhärennter Zellen erzielte.

4.1.3 Festlegung der Referenztransduktion

Auf Grundlage der Ergebnisse aus der MOI-Austestung (vgl. 4.1.1) und dem Vergleich der Transduktionsmethoden (vgl. 4.1.2), welche hohe Transduktionsraten in adhärent transduzierten U-251 MG mit einer MOI 2 für das IE1-Konstrukt zeigte, wurde dann für alle weiteren Transduktionen die Referenztransduktion festgelegt. Bei dieser erfolgt eine sechzehnstündige Inkubation von subkonfluenten U-251 MG par. mit einem MOI 2 des Konstrukts IE1 LV960 (vgl. 3.6.4).

4.2 Etablierung persistent transduzierter Tumor- Zelllinien

Zu diesem Zweck wurden transduzierte UKF-NB-3 und U-251-MG- Zellen über einen längeren Zeitraum passagiert und deren IE-Protein-Expressionsraten gegeneinander verglichen. Dabei konnte je eine stabil IE1- und eine stabil IE2-exprimierende U-251 MG-Zelllinie über einen längeren Zeitraum geführt werden.

4.2.1 Austestung der benötigten Puromycin-Konzentration

Um gewährleisten zu können nur transduzierte Zellen zu führen, wurde zunächst die effiziente Puromycin-Konzentration für jede Zelllinie bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach Protokoll umgesetzt und mit verschiedenen Puromycinkonzentrationen versehen, 24h bei 37°C inkubiert und dann der Anteil der lebenden Zellen mikroskopisch bestimmt (vgl. 3.5). Die Puromycin-Konzentration, bei welcher keine lebenden Zellen der parentalen Zellen und 100% Konfluenz der transduzierten Zellen der gleichen Zelllinie ermittelt wurden, wurde als Referenz-Konzentration für alle weiteren Passagen festgelegt.

Bei den parentalen Neuroblastom-Zellen waren bei einer Konzentration von 1 µg/ml Puromycin bereits keine lebenden Zellen mehr zu detektieren. Sowohl die mit dem IE1-Konstrukt transduzierten Zellen zweier Transduktionen als auch die mit dem IE2-Konstrukt transduzierten Zellen waren jedoch im Vergleich zu den MOCK-Zellen 100%ig konfluent (vgl. Tabelle 10). Somit

konnte eine Puromycin-Konzentration von 1 µg/ml für UKF-NB-3^{IE1} und UKF-NB-3^{IE2} als ausreichend effizient angesehen werden und wurde bei allen weiteren Passagen so verwendet.

Die parentalen Glioblastom-Zellen dagegen zeigten eine höhere Toleranz gegenüber Puromycin. So waren erst bei einer Konzentration von 5 µg/ml Puromycin im Medium keine lebenden Zellen mehr zu detektieren. Sowohl die mit dem IE1-Konstrukt transduzierten U-251 MG-Zellen als auch die mit dem IE2-Konstrukt transduzierten Zellen waren jedoch im Vergleich zu den MOCK-Zellen bei allen getesteten Puromycin-Konzentrationen 100%ig konfluent (vgl. Tabelle 10). Somit konnte eine Puromycin-Konzentration von 5 µg/ml für U-251 MG^{IE1} und U-251 MG^{IE2} als ausreichend effizient angesehen werden und wurde bei allen weiteren Passagen so verwendet.

Tabelle 10: Bestimmung der lebenden Zellen nach Passagieren mit verschiedenen Puromycin-Konzentrationen

Zelllinie	Puromycin-Konzentration				
	1µg/ml	2 µg/ml	3 µg/ml	4 µg/ml	5 µg/ml
UKF-NB-3 par. p280	0 lebende Zellen / Flasche	0 lebende Zellen / Flasche	0 lebende Zellen / Flasche	-	-
UKF-NB-3^{IE1} p280-31	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz	-
UKF-NB-3^{IE1} p280-41	100% Konfluenz	100% Konfluenz	60% Konfluenz	< 5% Konfluenz	-
UKF-NB-3^{IE2} p280-31	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz	90% Konfluenz	-
HFF p8	0 lebende Zellen / Flasche	-			

U-251 MG parental	< 5% Konfluenz	< 5% Konfluenz	< 5% Konfluenz	2 lebende Zellen / Flasche	0 lebende Zellen / Flasche
U-251 MG^{IE1}	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz
U-251 MG^{IE2}	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz	100% Konfluenz

4.2.2 Persistent transduzierte U-251 MG- und UKF-NB-3-Zelllinien im Vergleich

Bei beiden Versuchsreihen wurden die Zellen unter der ermittelten Puromycinkonzentration (vgl.4.2.1) geführt und es wurde regelmäßig mittels SLAB die relative Anzahl der IE1- bzw. IE2-exprimierenden Zellkerne bestimmt.

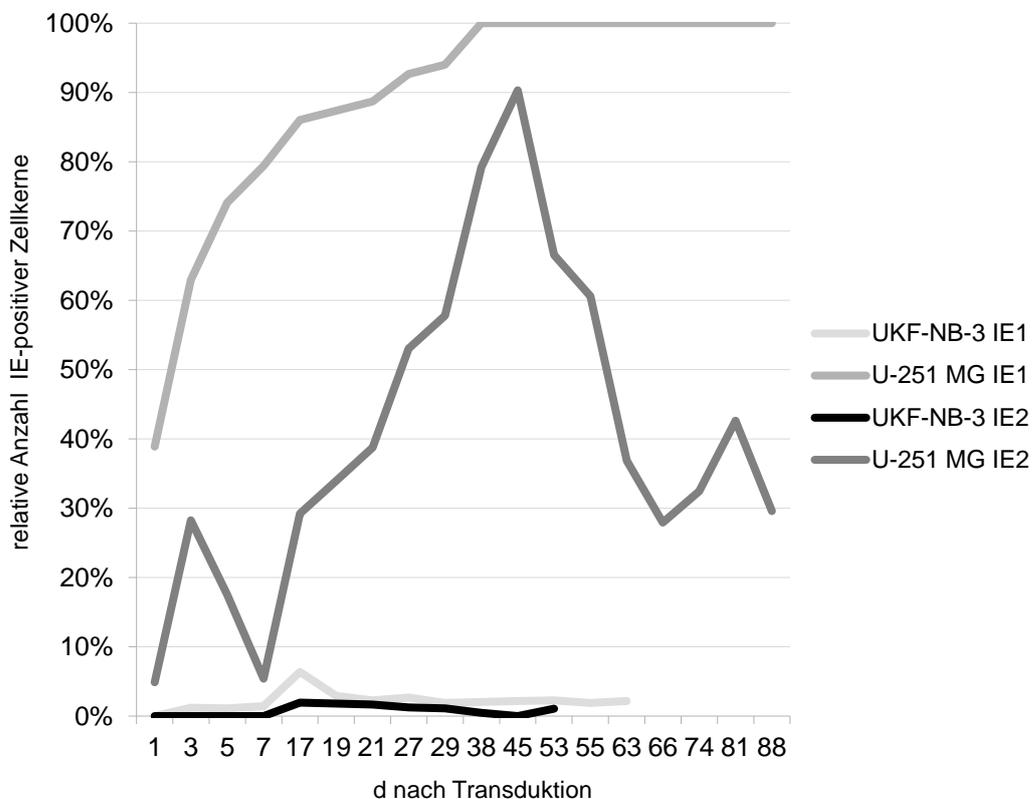


Abbildung 28: IE1 und 2-Antigen-Expression in persistent transduzierten UKF-NB-3- und U-251 MG-Zellen bestimmt mit SLAB

Es zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von 88 Tagen nach Transduktion, dass in den U-251 MG-Zellen mehr IE-Antigene exprimiert wurden als in den UKF-NB-3-Zellen.

Unter den Neuroblastom-Zellen exprimierten zwischen 96 und 100% weniger Zellkerne IE-Proteine gegenüber den Glioblastomzellen (s. Abbildung 28). Auch in diesen Versuchsreihen fiel die IE2-Expressionsrate gegenüber der IE1-Expressionsrate bei beiden Zelllinien ab. Am meisten geeignet für weitere Untersuchungen zeigte sich die IE1-transduzierte U-251 MG-Zelllinie (U-251 MG^{IE1}), in welcher ab Tag 38 nach Transduktion immer 100% der Zellkerne positiv auf IE1-Antikörper waren (s. Abbildung 28).

U-251 MG^{IE1} wurde auf Grund dieser Ergebnisse für alle weiteren Untersuchungen herangezogen (vgl. 4.3.2). Die Zelllinie UKF-NB-3^{IE2} wurde auf Grund ihrer niedrigen Expressionsrate von 2,16% IE2-positiver Zellkerne nach Tag 53, die Zelllinie UKF-NB-3^{IE1} mit 1,06% IE1-positiver Zellkerne nach Tag 63 verworfen. Die Zelllinien U-251 MG^{IE1} und U-251 MG^{IE2} wurden an Tag 88 nach Transduktion kryokonserviert und stehen nun, nach positiver Auftaukontrollen, für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Die Zelllinie U-251 MG^{IE1} wies an Tag 88 in der SLAB eine Expressionsrate von 100% IE1-Protein-positiver Zellkerne auf. Die Zelllinie U-251 MG^{IE2} wies an Tag 88 in der SLAB eine Expressionsrate von 30% IE2-Protein-positiver Zellkerne auf (s. Abbildung 29). In der IF-Färbung an Tag 89 zeigten sich die Zellkerne der Zelllinie U-251 MG^{IE1} mit Ausnahme der sich in Teilung befindlichen Zellen auch alle positiv auf IE1-Protein (s. Abbildung 30).

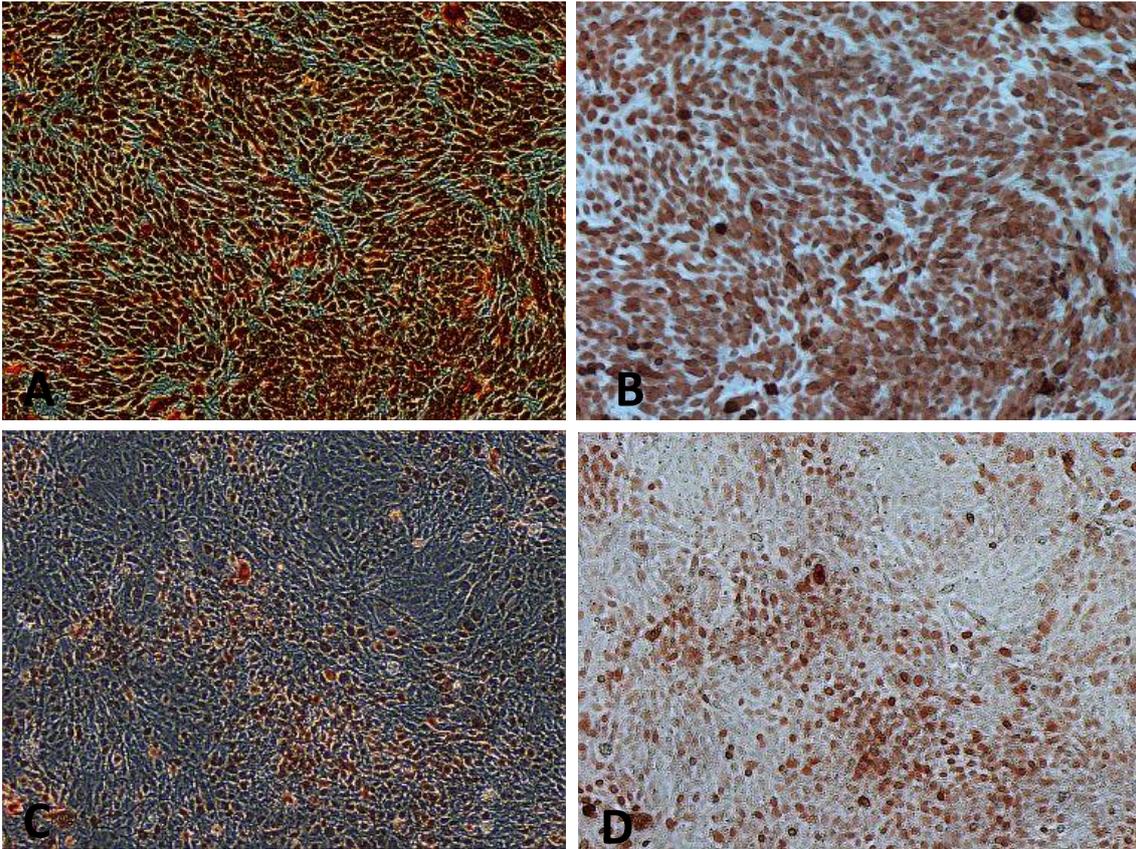


Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahme (10x) nach SLAB;

A U-251 MG^{IE1} p113-88; **B** U-251 MG^{IE1} p113-88;

C U-251 MG^{IE2} p113-88; **D** U-251 MG^{IE2} p113-88

Mit der Zelllinie U-251 MG^{IE1} konnte somit ein zuverlässig isoliert IE1 exprimierendes Zellmodell etabliert werden.

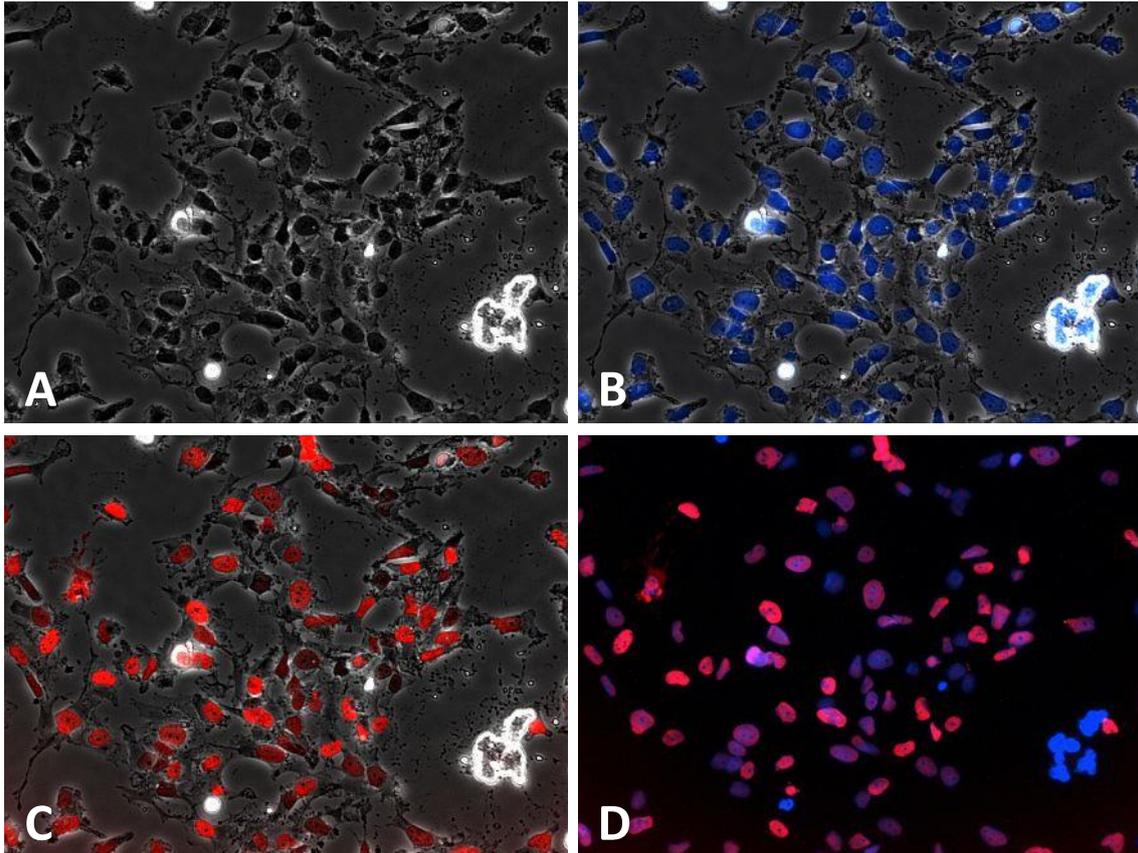


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach IF-Färbung von U-251 MG^{IE1} p113-89 an 89d p.t.;

A 200fache Vergrößerung ohne Fluoreszenz; **B** 200fache Vergrößerung der Kontrollfärbung auf DNA mit DAPI (blau); **C** 200fache Vergrößerung der Färbung auf IE1-Protein (rot); **D** 200fache Vergrößerung einer Doppelimmunfluoreszenzaufnahme DNA (blau) und IE1-Proteine (rot)

4.3 Untersuchung der Enterokinaseexpression

Im zweiten Teil der Arbeit sollte auf den Aspekt der gesteigerten Tumordinfiltration und Metastasierung HCMV-infizierter Tumore eingegangen werden. Dazu wurde auf Grundlage des erarbeitenden Protokolls (vgl. 3.6.4; 4.1) in akut-transduzierten und persistent-transduzierten U-251 MG-Zellen (vgl.3.6.4) der isolierte Einfluss von IE1-Protein auf die Enterokinase-Expression untersucht.

U-251 MG diente als onkologisches Zellmodell aufgrund der positiven Ergebnisse der vorangegangenen Versuche (vgl. 4.1 und 4.2). Aufgrund der bereits gezeigten onkomodulatorischen Effekte von IE1 (vgl. 1.3.1) und seiner höheren Expressionsraten in allen vorangegangenen Versuchen (vgl. 4.1 und

4.2) wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst nur die isolierte Auswirkung von IE1 auf die Enterokinase-Expression untersucht.

Parallel dazu wurde auch die Enterokinase-Expression in akut mit HCMV infizierten U-251 MG-Zellen untersucht.

4.3.1 Akut-Modell U-251MG-Zelllinie

Die Zellen wurden nach dem im Rahmen dieser Arbeit erarbeiteten Protokoll transduziert bzw. nach dem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll mit Vollvirus infiziert (vgl. 3.6.4 und 3.7). Bei beiden Versuchsreihen erfolgten an Tag 1, 3, 5 und 7 ein Abstoppen und die Bestimmung der relativen Proteinmenge von IE1 und Enterokinase mittels Western Blot (vgl. 3.8). Zusätzlich wurden in beiden Versuchsreihen an den Tagen 1, 3, 5 und 7 eine IF-Färbung (vgl. 3.10) auf IE1-Protein und Enterokinase-Antigene vorgenommen.

In beiden Versuchsreihen (lentiviral transduziert und mit Vollvirus infiziert) stellten sich die zeitlichen Verläufe der relativen Enterokinase-Proteinmenge in den jeweiligen drei Versuchsdurchführungen als so unterschiedlich dar, dass eine Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung in Anbetracht der geringen Anzahl von Versuchen statistisch nicht angemessen ist; stattdessen werden in dieser Arbeit die Einzelergebnisse dargestellt (s. Abbildung 33 bis Abbildung 38).

Abbildungen der originalen Westerns Blots (s. Abbildung 51 und Abbildung 52), aus welchen die in Abbildung 31 bis Abbildung 44 aufgeführten relativen Proteinmengen ermittelt wurden, sind unter 9.1 im Anhang zu finden. Auch die Daten der Abbildung 39 bis Abbildung 44 wurden daraus erhoben.

IE1-Expression:

Bei den IE1-transduzierten Zellen zeigte sich im Western Blot nach Quantifizierung, bezogen auf die Zeit, ein kontinuierlicher Anstieg der IE1-Expression. Bei den mit Vollvirus infizierten Zellen dagegen wurde ein

Maximum der IE1-Expression am fünften Tag erreicht; am siebten Tag fiel sie wieder ab (s. Abbildung 31 und Abbildung 32).

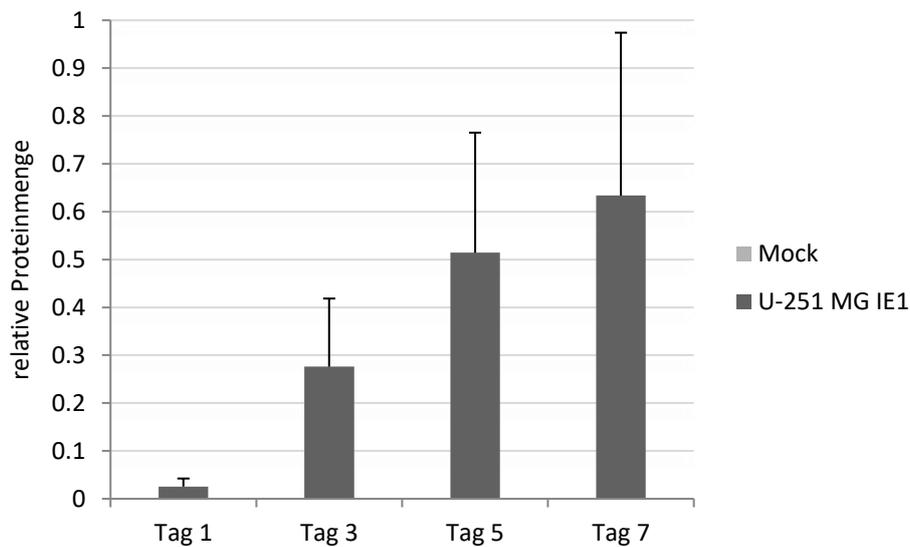


Abbildung 31: Quantitative Western Blot Auswertungen für IE1-Expression; Mittelwerte und Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsreihen; dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^t und $\tilde{\sigma}_{IE1}^t$ an 1, 3, 5 und 7d p.t. in IE1-transduzierten U-251 MG Zellen

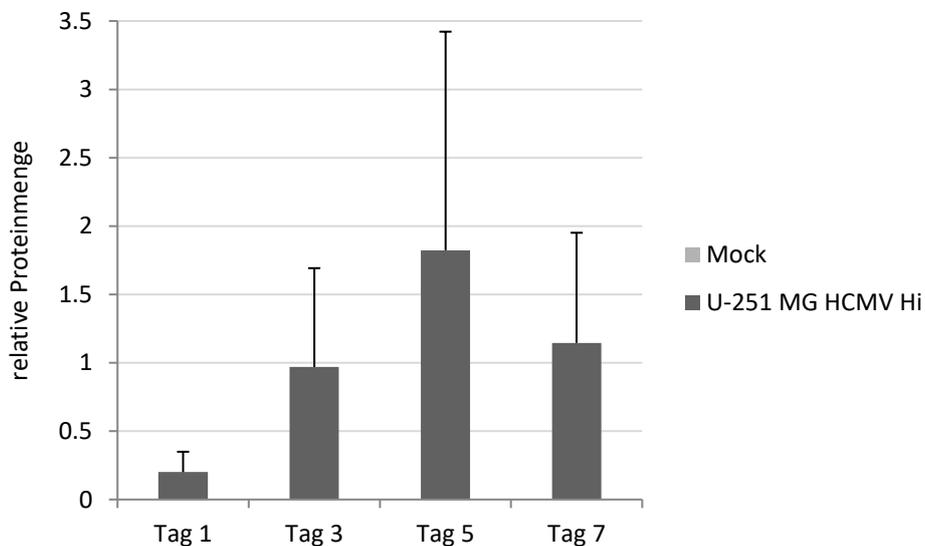


Abbildung 32: Quantitative Western Blot-Auswertungen für IE1-Expression; Mittelwerte und Standardabweichung drei unabhängiger Versuchsreihen; dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^i und $\tilde{\sigma}_{IE1}^i$ an 1, 3, 5 und 7d p.i. in mit HCMV-Hi91 infizierten U-251 MG Zellen

Enterokinase-Expression:

Enterokinase wurde sowohl in den Kontrollzellen (MOCK) als auch in den IE1-transduzierten Zellen exprimiert. Im Western Blot zeigte sich makroskopisch bei Inaugenscheinnahme der Banden in den Transduktionen zwei und drei jeweils an Tag sieben eine höhere Enterokinase-Proteinmenge in den transduzierten U-251 MG (vgl. Abbildung 51) im Vergleich zu den MOCK-Zellen. Nach Quantifizierung war dies auch noch abzulesen (s. Abbildung 34 und Abbildung 35); jedoch stellte sich die Differenz zwischen $\tilde{n}_{Enteroto}^{t7}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enteroto}^{t7}$ nicht als hoch genug heraus, als dass ihr eine Aussagekraft beigemessen hätte werden können. Denn ähnlich hohe Differenzen von $\tilde{n}_{Enteroto}^{tn}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enteroto}^{tn}$ wurden mit unterschiedlichen Vorzeichen auch in anderen Versuchen und an anderen Tagen n abgelesen (s. Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35).

Im zweiten Versuch lag $\tilde{n}_{Enteroto}^{tn}$ an jedem Tag nahe an $\tilde{\tilde{n}}_{Enteroto}^{tn}$; in den Versuchen eins und drei war jedoch kein deutlicher Zusammenhang sichtbar. Insgesamt gaben die Beobachtungen keine hinreichenden Anhaltspunkte zur Aufstellung einer Hypothese über einen systematischen Zusammenhang zwischen der Enterokinase-Expressionsrate in den transduzierten Zellen und den MOCK-Zellen (s. Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35).

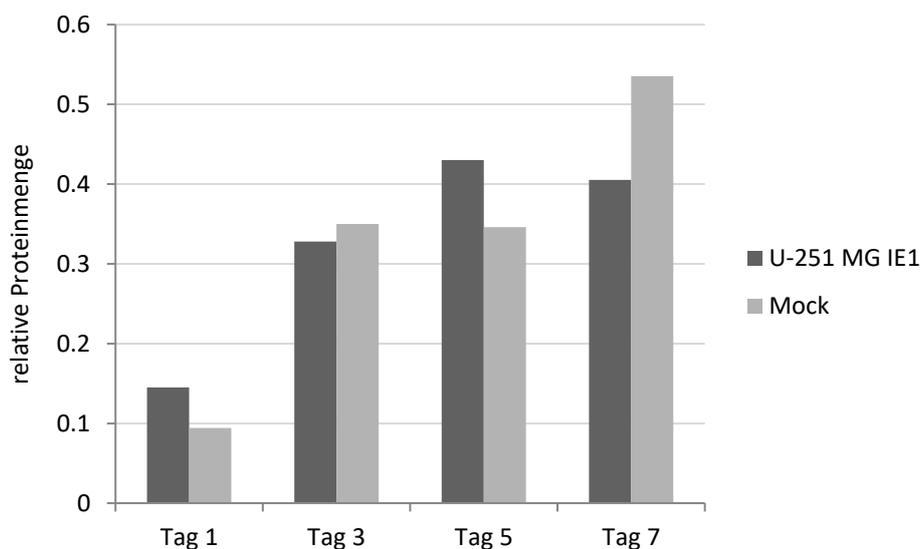


Abbildung 33: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Transduktion 1; dargestellt sind $\tilde{n}_{Enteroto}^{tn}$ und $\tilde{\tilde{n}}_{Enteroto}^{tn}$ für $n = 1,3,5,7$ in IE1-transduzierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen

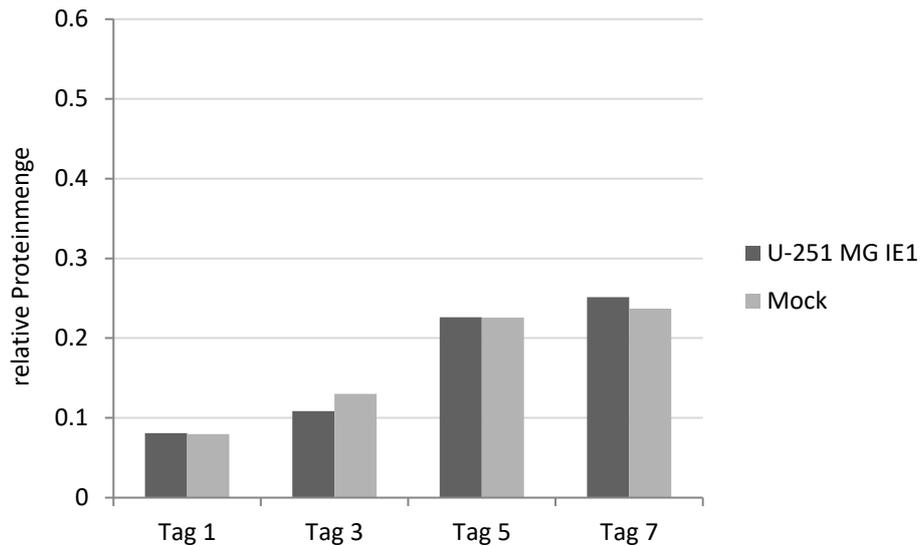


Abbildung 34: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Transduktion 2; dargestellt sind \tilde{n}_{Entero}^{tn} und $\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{tn}$ für $n = 1,3,5,7$ in IE1-transduzierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen

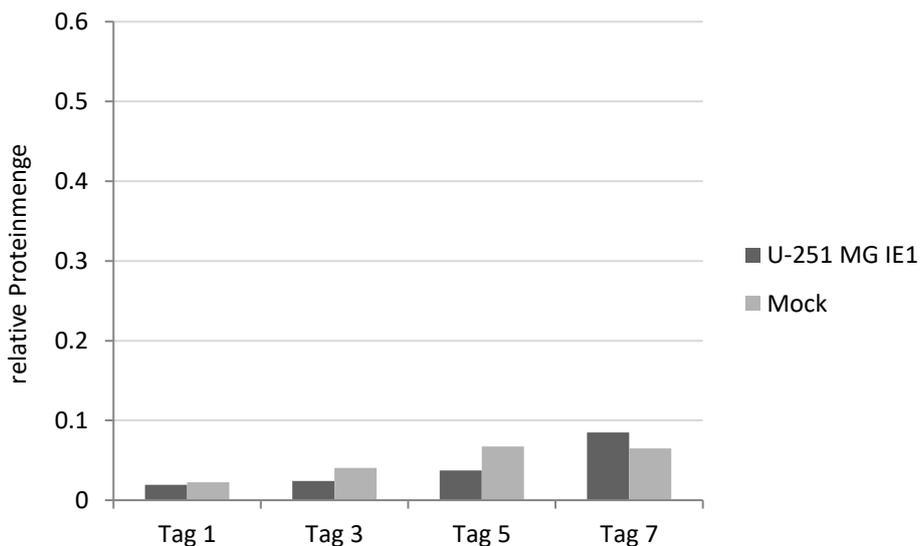


Abbildung 35: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Transduktion 3; dargestellt sind \tilde{n}_{Entero}^{tn} und $\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{tn}$ für $n = 1,3,5,7$ in IE1-transduzierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen

Auch bei den Versuchen zur Infektion mit Vollvirus wurde Enterokinase sowohl in den MOCK-Zellen als auch in den infizierten Zellen exprimiert. Wieder zeichnete sich kein deutlicher Zusammenhang zwischen \tilde{n}_{Entero}^{in} und $\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{in}$ ab (s. Abbildung 36, Abbildung 37 und Abbildung 38), was gegen die a-priori erstellte Hypothese des positiven Einflusses von IE1 auf die Enterokinaseexpression sprach.

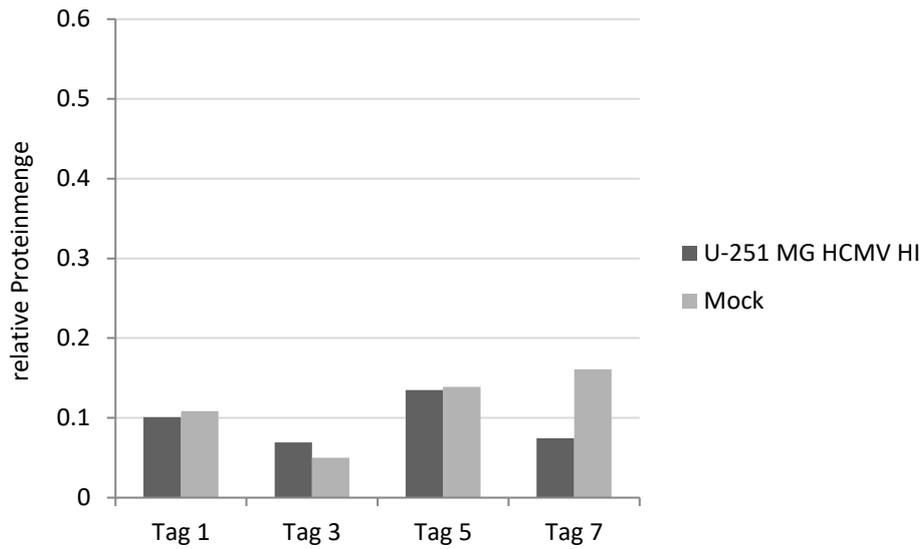


Abbildung 36: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Infektion 1; dargestellt sind \tilde{n}_{Entero}^{in} und $\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{in}$ für $n = 1,3,5,7$ in HCMV-Hi91 infizierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen

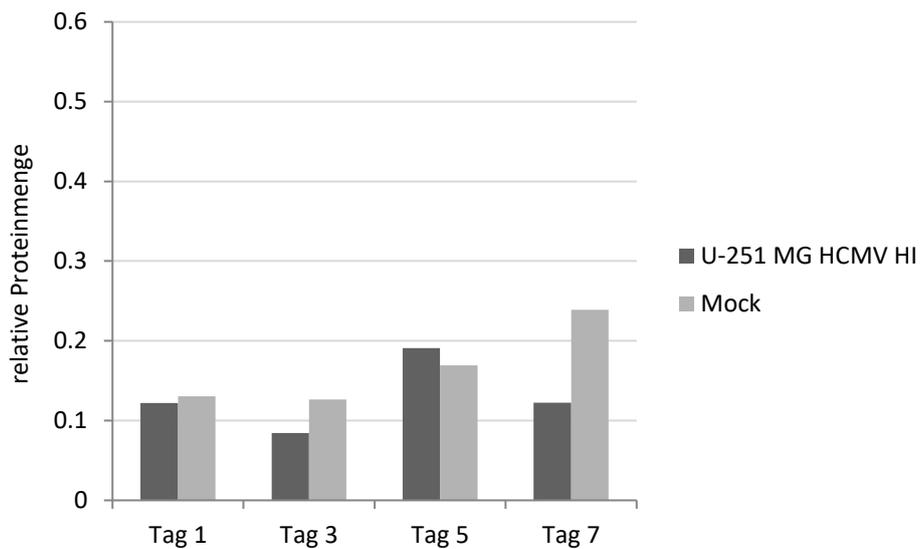


Abbildung 37: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Infektion 2; dargestellt sind \tilde{n}_{Entero}^{in} und $\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{in}$ für $n = 1,3,5,7$ in HCMV-Hi91 infizierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen

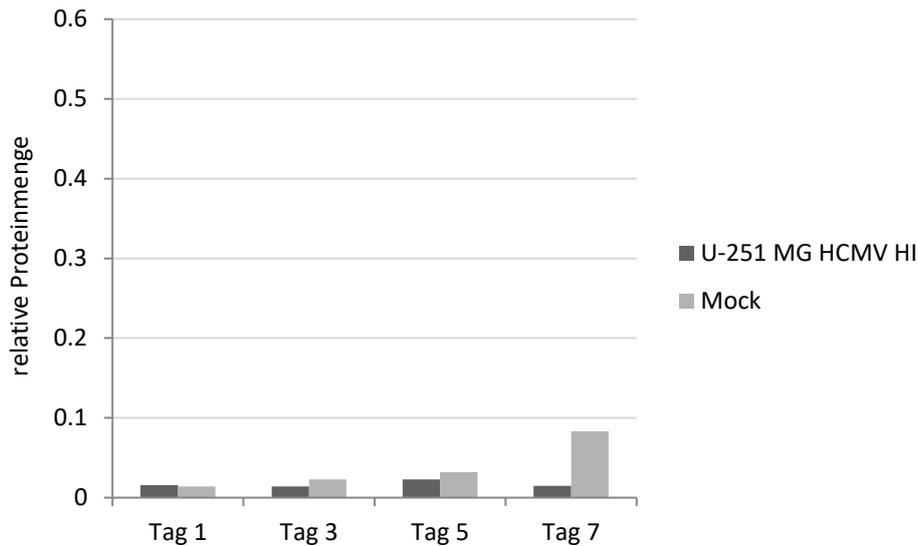


Abbildung 38: Quantitative Western Blot-Auswertungen für Enterokinase-Expression; Infektion 3; dargestellt sind \tilde{n}_{Entero}^{in} und $\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{in}$ für $n = 1,3,5,7$ in HCMV-Hi91 infizierten U-251 MG und in U-251 MG MOCK Zellen

Vergleich IE1- und Enterokinase-Expression:

Für den Vergleich von IE1- und Enterokinase-Expression wurde \tilde{n}_{Entero}^{xn} ins Verhältnis zu $\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{xn}$ gesetzt: $\frac{\tilde{n}_{Entero}^{xn}}{\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{xn}}$. Ein a-priori vermuteter Effekt von IE1 auf die Enterokinaseexpression hätte sich nämlich in diesem Verhältnis niederschlagen müssen. Eine Korrelation zwischen IE1- und Enterokinase-Expression wurde jedoch nicht beobachtet. Denn in keinem der Versuche wies $\frac{\tilde{n}_{Entero}^{xn}}{\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{xn}}$ im zeitlichen Verlauf eine deutliche positive oder negative Korrelation zur \tilde{n}_{IE1}^{xn} auf. Dieselbe Feststellung ließ sich für akut transduzierte ($x = i$) als auch infizierte ($x = t$) U-251 MG-Zellen treffen (s. Abbildung 39 bis Abbildung 44).

Vergleichende Graphen der IE1-Transduktionen von U-251 MG:

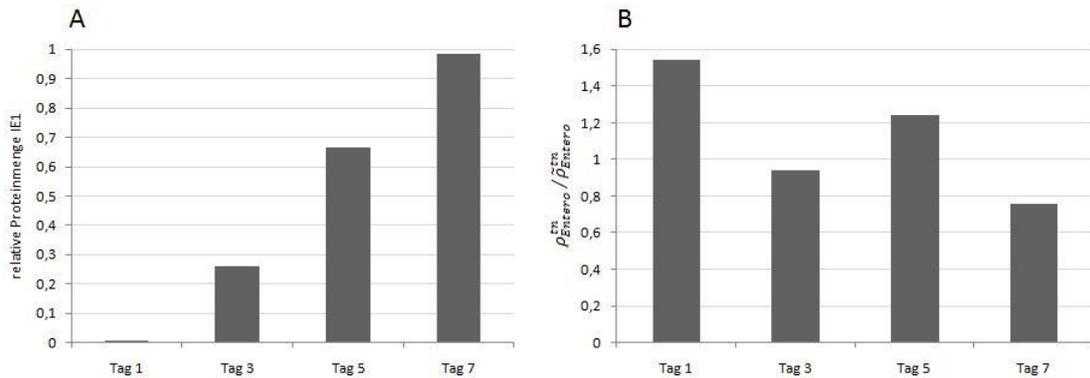


Abbildung 39: Western Blot-Auswertungen Transduktion 1;

A: dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^{tn} für $n = 1,3,5,7$; **B:** dargestellt sind $\frac{\tilde{n}_{Entero}^{tn}}{\tilde{n}_{Entero}^{tn}}$ für $n = 1,3,5,7$

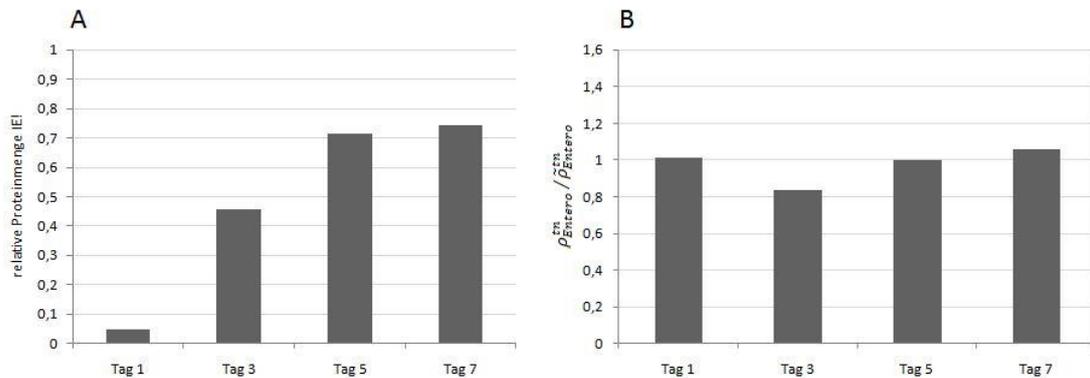


Abbildung 40: Western Blot-Auswertungen Transduktion 2;

A: dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^{tn} für $n = 1,3,5,7$; **B:** dargestellt sind $\frac{\tilde{n}_{Entero}^{tn}}{\tilde{n}_{Entero}^{tn}}$ für $n = 1,3,5,7$

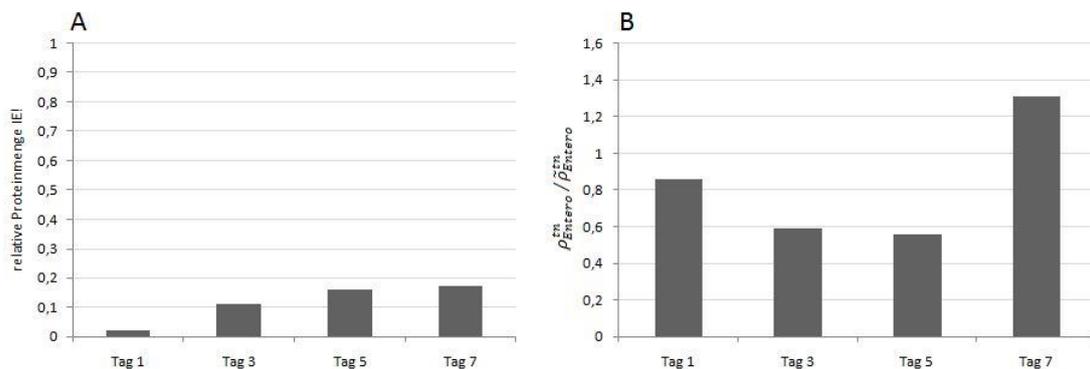


Abbildung 41: Western Blot-Auswertungen Transduktion 3;

A: dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^{tn} für $n = 1,3,5,7$; **B:** dargestellt sind $\frac{\tilde{n}_{Entero}^{tn}}{\tilde{n}_{Entero}^{tn}}$ für $n = 1,3,5,7$

Vergleichende Graphen der Infektionen mit HCMV-Hi91 von U-251 MG:

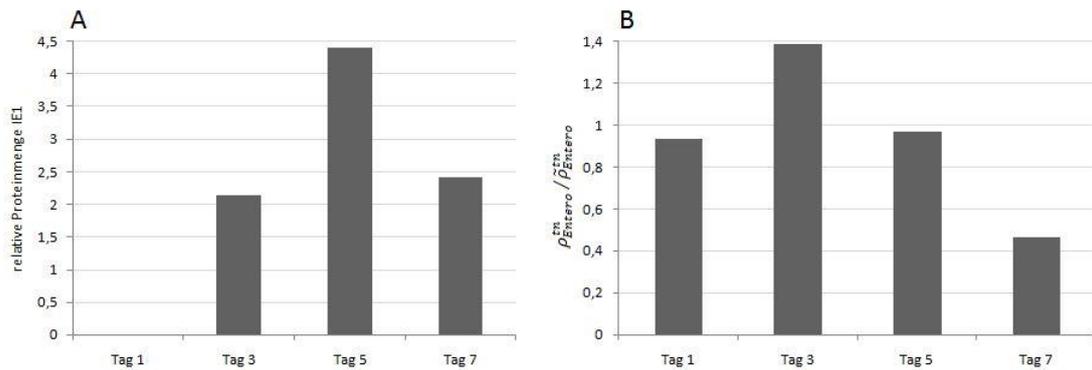


Abbildung 42: Western Blot-Auswertungen Infektion 1;

A: dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^{in} für $n = 1,3,5,7$; **B:** dargestellt sind $\frac{\tilde{n}_{Entero}^{in}}{\tilde{n}_{Entero}^{in}}$ für $n = 1,3,5,7$

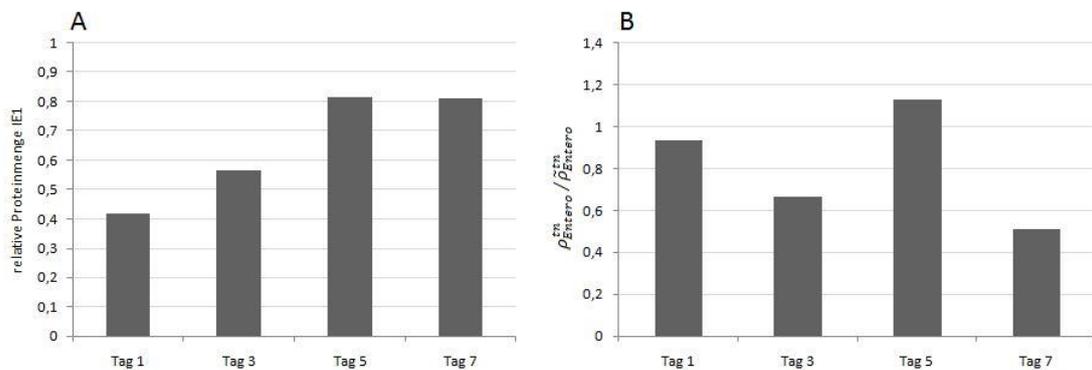


Abbildung 43: Western Blot-Auswertungen Infektion 2;

A: dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^{in} für $n = 1,3,5,7$; **B:** dargestellt sind $\frac{\tilde{n}_{Entero}^{in}}{\tilde{n}_{Entero}^{in}}$ für $n = 1,3,5,7$

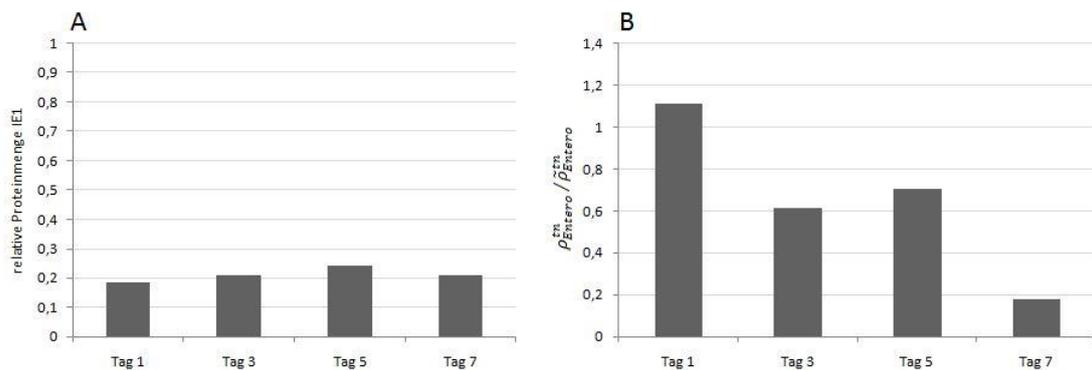


Abbildung 44: Western Blot-Auswertungen; Infektion 3;

A: dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^{in} für $n = 1,3,5,7$; **B:** dargestellt sind $\frac{\tilde{n}_{Entero}^{in}}{\tilde{n}_{Entero}^{in}}$ für $n = 1,3,5,7$

Beim mikroskopischen Vergleich der IF-Färbungen für Enterokinase in IE1 transduzierten U-251 MG und der U-251 MG MOCK zeigte sich ebenfalls im zeitlichen Verlauf kein deutlich positiver oder negativer Unterschied zwischen Enterokinase-Antigen positiven U-251 MG^{IE1} Zellen und U-251 MG MOCK (s. Abbildung 45).

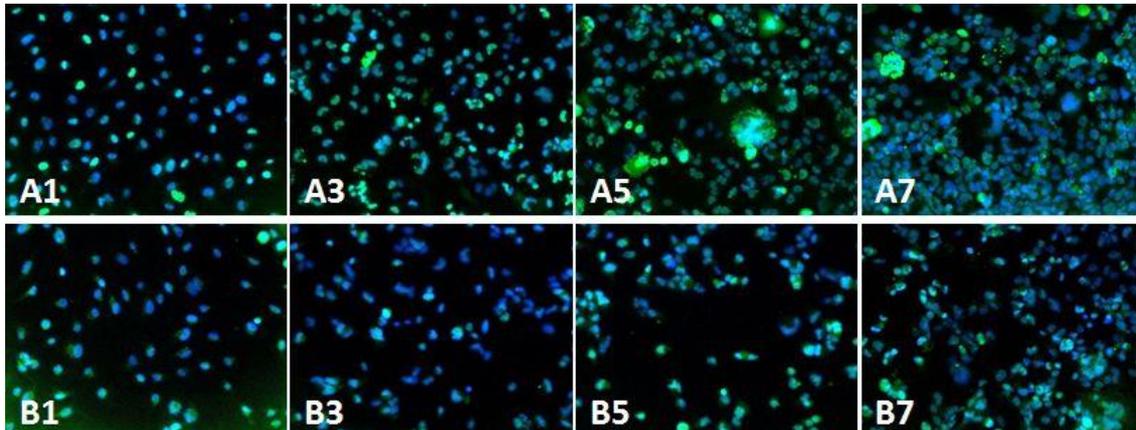


Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in 200facher Vergrößerung einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf DNA (blau) und Enterokinase-Antigen (grün); Transduktion 2;
A U-251 MG^{IE1} Zellen: **1:** 1d p.t.; **3:** 3d p.t.; **5:** 5d p.t.; **7:** 7d p.t.
B U-251 MG MOCK: **1:** 1d; **3:** 3d; **5:** 5d; **7:** 7d

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse aus Western Blot und IF-Färbung, von je drei unabhängigen Versuchsreihen für Transduktion und Infektion, wurde eine Beeinflussung der Enterokinase-Expression an Tag 1, 3, 5 und 7 p.t. und p.i. durch die Expression von IE1 ausgeschlossen. Die a-priori gestellte Hypothese über einen positiven Einfluss von IE1 auf die Enterokinaseexpression konnte somit widerlegt werden.

4.3.2 Persistent-transduzierte Zellen

U-251 MG Zellen wurden nach dem erarbeiteten Protokoll transduziert (vgl.4.1) und unter ermittelter Puromycin-Konzentration (vgl. 4.2.1) geführt und passagiert. Regelmäßig wurde dann die relative Proteinmenge mittels Western Blot (vgl. 3.8) bestimmt. Zusätzlich erfolgten Kontrollfärbungen mittels SLAB (vgl. 3.9) und IF-Färbung (vgl. 3.10).

Abbildungen der originalen Westerns Blots (s. Abbildung 53), aus welchen die in Abbildung 46 bis Abbildung 48 aufgeführten relativen Proteinmengen ermittelt wurden, sind unter 9.1 im Anhang zu finden.

Es konnte über einen Zeitraum von 88 Tagen eine konstante IE1-Expression im Western Blot (vgl. Abbildung 46), der IF-Färbung (s. Abbildung 49) und der SLAB (s. Abbildung 28) gezeigt werden.

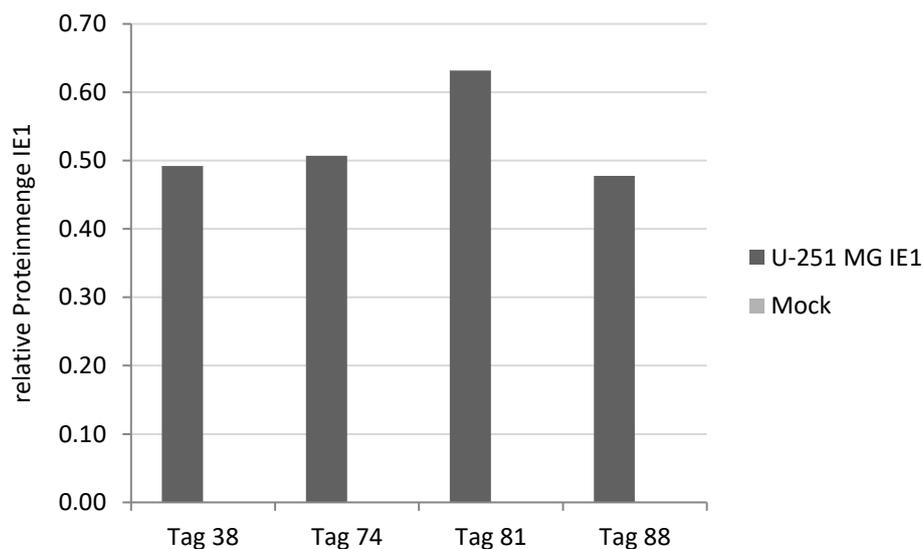


Abbildung 46: Quantitative Western Blot-Auswertungen: relative IE1-Proteinmenge an Tag 38, 74, 81 und 88 p.t. in U-251 MG^{IE1} und U-251 MG MOCK

Enterokinase wurde sowohl in den Kontrollzellen (MOCK) als auch in den IE1-transduzierten Zellen exprimiert. Differenzen von \tilde{n}_{Entero}^{tn} und $\tilde{\tilde{n}}_{Entero}^{tn}$ wurden mit unterschiedlichen Vorzeichen an allen Kontrolltagen n abgelesen, wobei die größten Differenzen an n 38 und 74 vorlagen (s. Abbildung 47). Insgesamt gaben die Beobachtungen keine hinreichenden Anhaltspunkte zur Aufstellung

einer Hypothese über einen systematischen Zusammenhang zwischen der Expressionsrate in den transduzierten Zellen und den MOCK-Zellen (s. Abbildung 47).

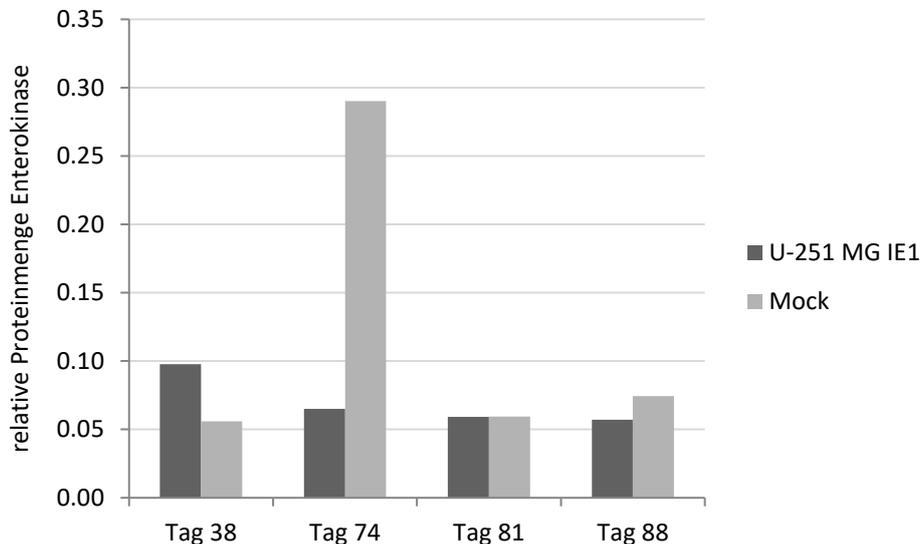


Abbildung 47: Quantitative Western Blot-Auswertungen der relativen Enterokinase-Proteinmenge an Tag 38, 74, 81 und 88 p.t. U-251 MG^{IE1} und U-251 MG MOCK

Auch für den Vergleich von IE1- und Enterokinase-Expression in persistent transduzierten U-251 MG^{IE1} wurde $\frac{\tilde{n}_{Enter}^{xn}}{\tilde{n}_{IE1}^{xn}}$ ermittelt, um einen a-priori vermuteten Effekt von IE1 auf die Enterokinaseexpression zu untersuchen. Eine Korrelation zwischen IE1- und Enterokinase-Expression wurde jedoch nicht beobachtet. Denn an keinem Kontrolltag n wies $\frac{\tilde{n}_{Enter}^{xn}}{\tilde{n}_{IE1}^{xn}}$ im zeitlichen Verlauf eine deutliche positive oder negative Korrelation zur \tilde{n}_{IE1}^{xn} auf (s. Abbildung 48).

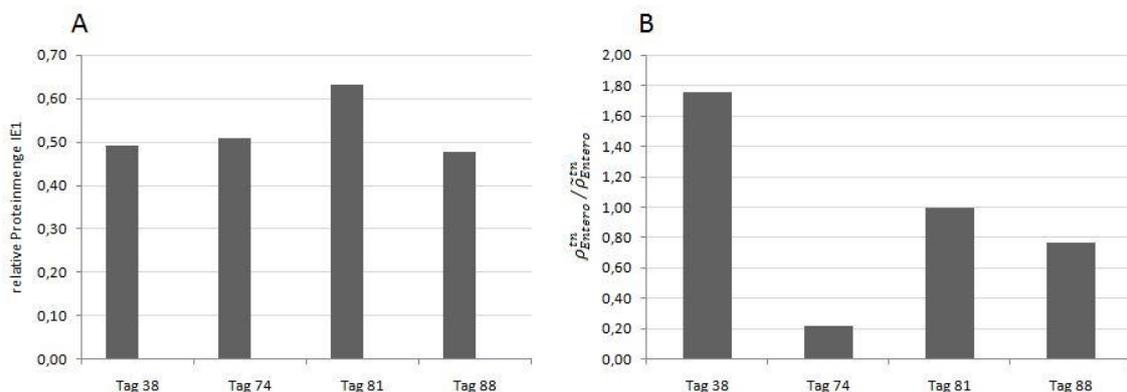


Abbildung 48: Western Blot-Auswertungen; U-251 MG^{IE1}; **A:** dargestellt sind \tilde{n}_{IE1}^{tn} für $n = 38, 74, 81, 88$; **B:** dargestellt sind $\frac{\tilde{n}_{Enter}^{tn}}{\tilde{n}_{IE1}^{tn}}$ für $n = 38, 74, 81, 88$

Auch beim mikroskopischen Vergleich der IF-Färbung auf Enterkinase der persistent transduzierten Zelllinie U-251 MG^{IE1} und der Zelllinie U251MG MOCK zeigten sich an den verschiedenen Kontrolltagen zwar durchaus positive oder negative Differenzen (vgl. B vs. D in Abbildung 49) der Enterkinase-Antige positiven Zellen, jedoch konnte auch hier keine Korrelation festgestellt werden.

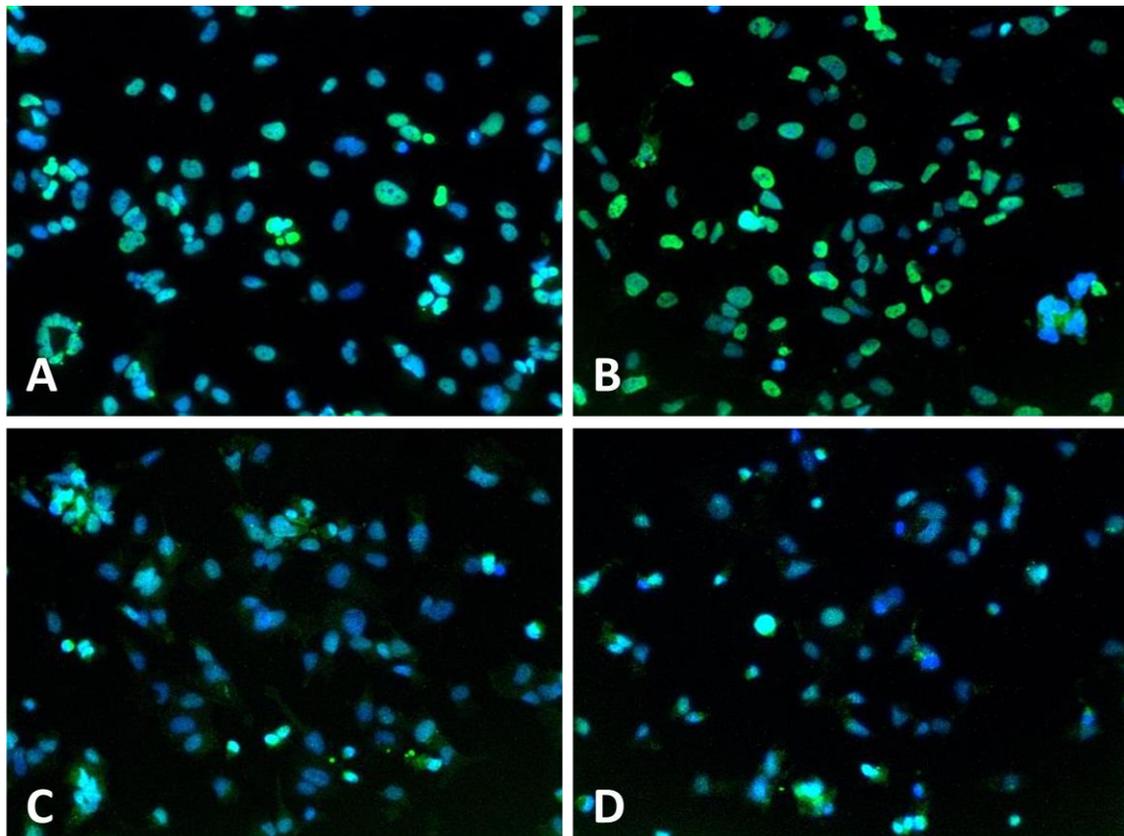


Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in 200facher Vergrößerung einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung auf DNA (blau) und Enterkinase-Antigen (grün) an U-251 MG^{IE1} und U-251 MG MOCK.

A U-251 MG^{IE1} 81d p.t.; **B** U-251 MG^{IE1} 89d p.t.;
C U-251 MG MOCK 81d p.t.; **D** U-251 MG MOCK 89d p.t.;

Somit bestätigte sich das Ergebnis des Akutmodells und legte nahe, dass auch bei einer persistenten HCMV-Infektion die Enterkinase-Expression nicht durch IE1-Proteine beeinflusst wird, dies kann aber nicht mit Sicherheit gesagt werden.

5 Diskussion

HCMV ist ein Virus mit einer weltweit sehr hohen Prävalenz und es stellt nach wie vor ein erhebliches Risiko in der Schwangerschaft und für immunsupprimierte Patienten dar. Dabei ist seine Pathogenese weiterhin nur unzureichend bekannt und eine Immunisierung nicht möglich. Ein Einfluss des Virus auf die Tumormalignität konnte gezeigt werden (vgl. 1.1.2 und 1.3). Jedoch ist die Aufklärung der der viralen Onkomodulation zugrundeliegenden Mechanismen, insbesondere der Frage, wie und wann Tumorwachstum und -invasion durch HCMV beschleunigt werden, Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Um diese zugrundeliegenden Mechanismen besser verstehen zu können, sollte in dieser Arbeit die Grundlage geschaffen werden, die Rolle der beiden immediate-early-Proteine IE1 und IE2 besser untersuchen zu können. So bestand die Notwendigkeit, die Proteine außerhalb des viralen HCMV-Systems isoliert zu exprimieren, um die zellulären Reaktionen auf IE1 und IE2 darstellen zu können. Eine Erfolg versprechende Möglichkeit dies zu verwirklichen lieferte der lentivirale Gentransfer, bei welchem die IE1-kodierende Sequenz bzw. die IE2-kodierende Sequenz in das zelluläre Genom integriert wurde. Die zum c-DNA-Transfer in diese Arbeit verwendeten HIV-1-abgeleiteten lentiviralen Vektoren boten wichtige Vorteile. So ist der Gentransfer in einem breiten Wirtszellspektrum möglich und auch eine Transduktion von nicht-teilenden, einschließlich terminal differenzierten Zellen, durchführbar. Darüber hinaus bietet der Gentransfer mit lentiviralen Vektoren eine sehr gute Transduktionseffizienz von bis zu 100% (vgl. 4.1.1) und eine stabile Integration der zu transferierenden Gene ins Wirtsgenom. Obgleich die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren nur konstitutiv die Kontrollproteine exprimierten, so sind sie doch auch mit einem induzierbaren Plasmid verfügbar. ⁷¹⁻⁷³

Diese induzierbaren Konstrukte hätten Anwendung finden können bei der Etablierung persistent transduzierter Zellkulturen. Denn es gibt Hinweise darauf, dass sich eine kontinuierliche IE1-Expression nicht mit genomischer Integrität und normaler Zellproliferation vereinbaren lässt, was bei weiterführenden Untersuchungen an den persistent transduzierten Zelllinien beachtet werden

sollte.^{22, 62, 74} Zu diesem Aspekt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen angestellt und sollte in weiteren Arbeiten berücksichtigt werden. Wiederum könnte künftig mit einem induzierbaren System dieses mögliche Problem kontrolliert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt des lentiviralen Gentransfers ist jedoch, dass Zellen unabhängig des transferierten Genoms mit einer Stressantwort auf die Lentivirusinfektion reagieren. Dieser Effekt zeigte sich deutlich bei der ersten Transduktion von UKF-NB-4 mit dem IE1-Konstrukt und einem MOI > 10. Da zeigten sich bereits nach vier Stunden Transduktion bei einer Vielzahl der Zellen Zeichen wie Verlust der Adhäsion und kugelige Zellform. Die Dokumentation dieser Zellreaktionen floss nicht in den Ergebnisteil ein, die Aufnahme dazu ist unter 9.2 im Anhang ersichtlich. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch diesen Effekt zu minimieren, sollten in allen Versuchen die Kontrollzellpopulation ebenfalls lentiviral mit einem „leeren“, also IE-c-DNA-freien, pLKO-Grundgerüst behandelt werden. In dieser Hinsicht ließe sich das für die vorliegende Arbeit gewählte experimentelle Vorgehen noch verbessern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Transduktionsverfahren, die Transduktion in Suspension und die Transduktion von adhären Zellen, gegeneinander getestet (vgl. 3.6.2, 3.6.3 und 4.1.2). Dabei zeigten sich bei den Zelllinien UKF-NB-3, HFF und U-251 MG unter der Transduktion in Zellsuspension niedrigere Transduktionsraten als unter Transduktion adhären Zellen. Man muss dieses Ergebnis mit Vorbehalt betrachten, da bei den beiden Transduktionsverfahren nicht bei allen Zellen und Konstrukten mit den gleichen MOI gearbeitet wurde (s. Tabelle 6). Darüber hinaus verblieb der lentivirale Überstand bei der Transduktion in Suspension bis zum Abstoppen in der Zellkultur, wohingegen bei der Transduktion von adhären Zellen bereits nach sechzehn Stunden der lentivirale Überstand abgewaschen wurde. Die sehr niedrigen Transduktionsraten dieser Versuchsreihen bei den Zellen HFF und UKF-NB-3 lassen plausibel erscheinen, wenn man sich die Ergebnisse der MOI-Austestung vergegenwärtigt. Dort zeigte sich bei beiden Zelllinien unter beiden Konstrukten bei einem MOI 10 nur mäßige bis schlechte Transduktionsraten. In den Versuchsreihen zum Vergleich

der Transduktionsmethoden dagegen wurde mit maximal einem MOI 4 (UKF-NB-3 adhärent) ansonsten nur MOI 2 (UKF-NB-3 in Suspension; HFF adhärent und in Suspension) gearbeitet.

Trotz kritischer Betrachtung der Ergebnisse aus der MOI-Austestung (vgl. 4.1.1) und dem Vergleich der Transduktionsmethoden (vgl. 4.1.2) wurde auf Grundlage dieser für alle weiteren Transduktionen die Referenztransduktion festgelegt. Unter dieser erfolgte eine sechzehnstündige Inkubation von subkonfluenten U-251 MG par. mit einem MOI 2 des Konstrukts IE1 LV960 (vgl. 3.6.4), was sich bei späteren Versuchsreihen zur Enterokinase-Expression im Akut-Modell als zuverlässige Methode erwies. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Erprobung einer effizienten Transduktionsmethode und den verwendeten Vektoren eine zuverlässige Etablierung eines induzierbaren IE1- und IE2-Expressionssystems gelungen ist.

Als primäre Zelllinie entschied man sich in dieser Arbeit für HFF, da diese als gut permissiv für HCMV gelten.⁴² Die Infektiosität und Virusreplikation ist in U-251 MG im Vergleich zu HFF stark reduziert.⁷⁵ Im Gegensatz dazu zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass die Transduktionseffizienz der HFF von maximal 19% gegenüber der U-251 MG von bis zu 100% in allen Versuchen stark abfiel. Es war somit nicht möglich, die Permissivität gegenüber HCMV auf die Lentiviren zu übertragen. Ähnliches zeigte sich auch bei beiden Neuroblastomzelllinien, welche sich in der Vergangenheit im Rahmen der Arbeiten von Cinatl jr. et al. als gut permissiv für HCMV erwiesen. So zeigte sich UKF-NB-3 mit maximal 47% beim IE1-Vektor und nur 13% beim IE2-Vektor gegenüber der bis zu 100% der U-251MG viel schwächer transduzierbar. Gönczöl et al beschrieb, dass die Permissivität gegenüber HCMV stark von dem Differenzierungsgrad einer Wirtszelle abhängig ist.⁴⁰ Es ist nicht bekannt, ob Gleiches auch für lentivirale Vektoren gilt, dies könnte aber eine mögliche Erklärung für die schlechte Transduzierbarkeit der Neuroblastomzelllinien liefern. Dies kann jedoch auf dem momentanen Wissensstand zu den hier verwendeten lentiviralen Vektoren nur hypothetisch betrachtet werden.

Der Differenzierungsgrad könnte sich jedoch auch auf eine frühe Blockierung der Virusreplikation bzw. Transduzierbarkeit auf Zellkernebene auswirken.

Denn es ist bekannt, dass zahlreiche zelluläre Faktoren, wie p53, ATF und Rb, sowie weitere Transkriptionsfaktoren eine tragende Rolle bei der Initiation der viralen Genexpression spielen.⁷⁶ Dafür würden die Ergebnisse dieser Arbeit im Bereich der latent transduzierten UKF-NB-3 sprechen (vgl. 4.2.2). So lagen die Raten IE1-positiver Zellkerne zumeist unter 3% bei den persistent transduzierten, mit ausreichend Puromycin geführten UKF-NB-3^{IE1}. Dies würde dafür sprechen, dass das Vektorplasmid inklusive der Puromycin-Resistenz bei 100% der Zellen integriert wurde, aber nur unter 3% dieser Zellen IE1 exprimierten.

Die Raten der IE2-positiven Zellkerne lagen sowohl bei den persistent transduzierten UKF-NB-3^{IE2} als auch den U-251 MG^{IE2} im Verhältnis zu den IE1-transduzierten Zellen, der jeweils gleichen Zellart, viel niedriger (vgl. 4.2.2). Bei U-251 MG^{IE2} kam es ab 45d p.t. zu einem starken Abfall der IE2-Expression, bei UKF-NB-3^{IE2} lag sie an Tag 45 sogar bei < 0,00% (vgl. 4.2.2). Wenn man davon ausgeht, dass alle persistent geführten Zellen das Vektorplasmid integriert haben, könnte eine Erklärung neben unterschiedlicher Differenzierungsgrade der Wirtszellen, eine Hemmung der Translation in Latenz sein. So zeigte sich bei Vollvirusinfektion von Glioblastomzellen eine fehlende Translation von IE2 in Latenz.⁷⁷

Bei den Western Blot-Ergebnisse des Akut-Modells in U-251 MG wichen die relativen Proteinmengen von IE1 und Enterokinase zwischen den drei unabhängigen Versuchen sowohl bei Infektion als auch Transduktion stark voneinander ab. Es ist bekannt, dass Tumorzelllinien sich mit fortschreitender Passage biologisch verändern, worauf sich diese unterschiedlichen Ergebnisse zurückführen lassen können. In diesem Punkt ließe sich das für die vorliegende Arbeit gewählte experimentelle Vorgehen noch verbessern, indem man alle drei unabhängigen Versuche und auch alle anderen Untersuchungsmethoden wie der IF-Färbung mit der gleichen Passage von Zellen durchführt.

Um die IF-Färbungen der akut und persistent transduzierten U-251 MG besser bewerten zu können, hätte man neben der visuellen Interpretation der Ergebnisse auch eine technische Auswertung der Farbintensität durchführen müssen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies auf zwei unterschiedlichen

Methoden versucht, floss jedoch nicht in den Ergebnisteil ein. Bei der ersten Auswertungsmethode wurden nur alle Bilder IF- gefärbten, IE1-transduzierten U-251 MG an Tag 1, 3, 5, 7 aus zwei Transduktionen verwendet und drei Farbkanäle (blau: DAPI, grün: Enterokinase, rot: IE1) gemessen. Dabei nahm man an, dass zum einen die Farbintensität ein Maß für Anzahl der exprimierten Proteine sei und dass die Farbintensität des blauen Kanals (DAPI) ein Maß für die allgemeine Expressionstätigkeit der Zelle und somit zur Normierung der anderen beiden Kanäle (rot: IE1 und grün: Enterokinase) verwendet werden könnte. Es wurde für alle drei Kanäle die mittlere Farbintensität für jede Zelle gemessen. Im Anschluss wurde der IE1- und der Enterokinasewert für jede Zelle durch ihren DAPI-Wert dividiert. Beim Auftragen der normierten IE1 gegen die normierten Enterokinasewerte (ein Punkt pro Zelle) zeigte sich eine deutlich positive Korrelation. Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu den Western-Blot-Ergebnissen und es wurde angenommen, dass diese Auswertungsmethode ungeeignet oder fehlerhaft sei. Bei der Zweiten Auswertungsmethode wurden alle Bilder der IF- Färbung der IE1-transduzierten U-251 MG an Tag 1, 3, 5, 7 aus zwei Transduktionen und die jeweiligen Parentalen verwendet und zwei Farbkanäle (blau: DAPI, grün: Enterokinase) gemessen. Unter der Annahme, dass auch hier die Farbintensität ein Maß für Anzahl der exprimierten Proteine sei und die Messung auf die Flächen eingeschränkt werden kann, welche von den Zellkernen eingenommen wird, ging man wie folgt vor: Es wurde die von Zellkernen eingenommenen Flächen durch Betrachtung der DAPI-Bilder und Anwendung eines Schwellenwertes bestimmt. Dann wurde die mittlere Farbintensität des grünen Farbkanals (Enterokinase) bestimmt. Hier zeigte sich, dass die Werte der ersten IE1-Transduktion um ein vielfaches höher als in den parentalen Zellen waren; in den Bildern der zweiten IE1-Transduktion dagegen etwas niedriger als in den parentalen Zellen. Auch hier konnte eine Fehlerhaftigkeit der Auswertungsmethode oder eine Beeinflussung der Ergebnisse durch zufällige Faktoren (wie z.B. den Bildausschnitt) nicht ausgeschlossen werden, weshalb auch diese Methoden keine Verwendung im Ergebnisteil fand.

Frühere Ergebnisse konnten zeigen, dass die Adhäsion und Transmigration an Endothelzellen von HCMV infizierten Neuroblastomzellen gegenüber

unifizierten Zellen erhöht ist.^{60, 61} Es ist jedoch bisher weitgehend unklar, wie HCMV die Invasion, Migration und letztlich die Metastasierung fördert. So postulierte zum einen Koshikawa et al, das in Tumorgewebe exprimierte Trypsin den Abbau von extrazellulären Matrixproteinen steigert und MMP aktiviert und somit die Invasion und Metastasierung fördert. Auch wiesen die Autoren Trypsin in verschiedenen Tumoren und Tumorgeweben nach.^{65, 66} Desweiteren zeigte Miyata et al, dass Trypsin zur Invasion beitrage, indem es die $\alpha 5\beta 1$ abhängige Adhäsion von Fibronectin stimuliert.⁶⁷ Zusammen mit den Ergebnissen von Scholz et al, dass persistent HCMV infizierte Neuroblastomzellen eine erhöhte $\alpha 5\beta 1$ -Aktivität zeigten,⁶¹ nahm man an, dass die Erhöhung der $\alpha 5\beta 1$ -Aktivität über eine Enterokinase vermittelte Trypsinaktivität entstehe.⁶⁸ So untersuchte man in der Arbeit von Hoever et al neben zehn weiteren Proteinen auch die Enterokinase- Genexpression an 5 verschiedenen, persistent HCMV infizierten Neuroblastomzelllinien. Wie auch in der vorliegenden Arbeit waren die Ergebnisse von Hoever et al zur Enterokinaseexpression nicht konklusiv, wobei sich ein eher positiver Trend zeigte: Im Vergleich zu den jeweiligen MOCK-Zellen zeigte sich bei einer Zelllinie (UKF-NB-4^{Hi91}) eine deutliche Hochregulierung, bei zwei Zelllinien (MHH-NB-11^{AD169} und UKF-NB-4^{AD169}) eine marginale Hochregulierung, bei einer Zelllinie (MHH-NB-11^{Hi91}) nichts und bei einer Zelllinie kam es sogar zur einer Downregulation.⁶⁸ In der vorliegenden Arbeit ließen sich weder in den Versuchen zur Transduktion noch zur Infektion deutliche Hochregulierungen der Enterokinase feststellen (vgl. 4.3). Wir konnten somit die Ergebnisse von Hoever et al in dem vorliegenden Zellmodell nicht bestätigen. Allerdings gab es in dieser Arbeit auch keine Versuchsreihen mit persistent HCMV infizierten Neuroblastomzellen. Jedoch kann die a-priori erstellte Hypothese, dass über einen positiven Einfluss von IE1 auf die Enterokinaseexpression die Tumorinvasion gefördert wird, in dem etablierten Modell sicher widerlegt werden (vgl. 4.3) und es wurde Raum geschaffen für neue Überlegungen (s. Abbildung 50).

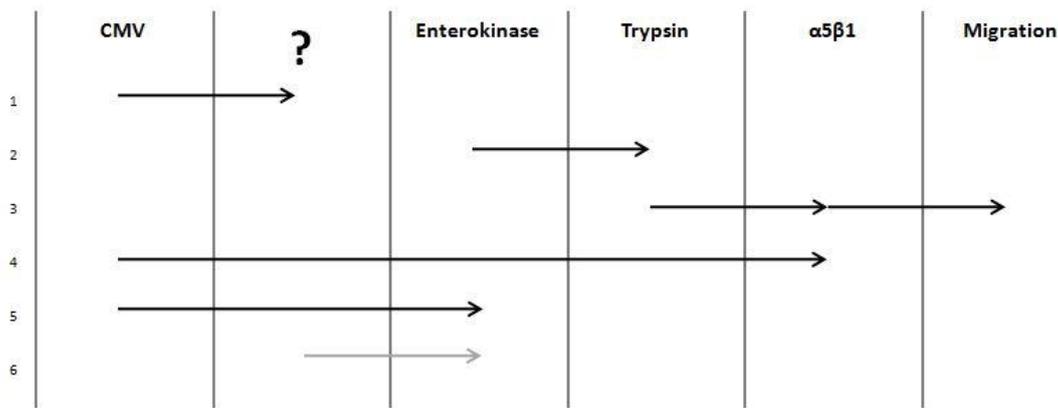


Abbildung 50: Empirische Zusammenhänge, zwischen HCMV-Infektion, der Expression verschiedener Proteine und der Tumormigration:

1 Mögliche Grundlage künftiger Untersuchungen; 2 Koolmann/Röhm (2009)⁶³; 3 Miyata (2000)⁶⁷; 4 Scholz (2000)⁶; 5 Hoefer (2005)⁶⁸; 6 Mögliche Grundlage künftiger Untersuchungen

Eine Überlegung könnte an dieser Stelle sein: Wenn es unter HCMV zu einer Hochregulierung der Enterokinaseexpression kommt, aber nicht unter IE1-Lentivirus, welches andere HCMV-Produkt für die Hochregulation verantwortlich gemacht werden kann. Unter Berücksichtigung der Problematik mit der fehlende Translation von IE2 in Latenz (s.o.) stellt eine weitere Untersuchung zur Beeinflussung der Enterokinaseexpression durch IE2 auf den Grundlagen des hier erarbeiteten Protokolls und mit den vorhandenen, persistent transduzierten Zelllinie U-251 MGIE2, einen sinnvollen nächsten Schritt dar.

Ein weiteres Gedankenmodell bezieht sich auf das Tumorstroma:

Zwar gab es Ergebnisse über HCMV positive Tumore, in deren angrenzendem Gewebe keine HCMV-Proteine und –Nukleinsäuren gefunden wurden (vgl. 1.3).^{50–55}, doch sieht man einen Tumor als Einheit aus transformierten Zellen und Tumorstroma an, in welcher es zu engen Interaktionen kommt.⁷⁸ In dieser Arbeit wurde jedoch nur die Tumorzelle in die Hypothese und Untersuchungen einbezogen. So scheint es interessant zu wissen, wie eine HCMV-Infektion des Tumorstromas die Migration und Infiltration des Tumors beeinflusst. Hier rücken besonders die Endothelzellen in den Fokus. Denn es ist bekannt, dass die Adhäsion und Transmigration an Endothelzellen von HCMV infizierten Neuroblastomzellen erhöht ist.^{60, 61}. Jedoch weiß man nicht, ob nicht auch die Endothelzellen ihrerseits ihre biologischen Eigenschaften durch eine

persistente HCMV-Infektion zu Gunsten der Adhäsion und Transmigration verändern.

Endothelzellen begrenzen den Intravasalraum und stellen keine einheitliche Population dar. Sie unterscheiden sich stark in Ihrer Enzymausstattung und im Schwerpunkt Ihrer Funktionen. Zu diesen zählen der Gasaustausch, Diffusionskontrolle, Regulation der Blutgerinnung und Gefäßweitstellung, als auch Vermittlung von Adhäsion und Leukozytenmigration während immunologischer Prozesse.⁷⁹ Bereits 1984 wurde durch Ho et al die erste erfolgreiche in vitro HCMV-Infektion von Endothelzellen durchgeführt⁷ und seither gibt es bereits einige Erkenntnisse über die Rolle der Endothelzelle bei der HCMV-Infektion. So wurde gezeigt, dass bei seropositiven, gesunden Individuen in vielen Fällen HCMV in Endothelzellen nachgewiesen werden kann.^{80, 81} Ferner hat eine HCMV-Infektion Einfluss auf die Leukozytenadhäsion⁸², die Endothel-Permeabilität⁸³, die Entstehung einer proinflammatorischen Umgebung⁸⁴, Adhäsion und Transmigration^{60, 61}. Dies legt, zusammen mit den physiologischen Endothelzelle-Eigenschaften⁷⁹, die Vermutung nahe, dass persistent infizierte Endothelzellen die Tumormigration und somit Metastasierung erleichtern. Dies sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und könnte mit Hilfe der lentiviralen Vektoren untersucht werden.

Die Invasion und der Einbruch von Tumorzellen in die Blutbahn sind wichtige Stadien der malignen Progression und die Grundlage für Fernmetastasen. Fernmetastasen sind das zentrale Merkmal der Malignität und stehen im direkten Zusammenhang mit dem Outcome des Patienten. So sterben 90% der Patienten mit einer malignen Erkrankung an den Folgen der Metastasierung.⁷⁸ Um therapeutische Strategien, welche der Invasion und Metastasierung entgegen wirken, zu verbessern bzw. zu entwickeln, ist es unerlässlich, die den zugrunde liegenden, onkomodulatorisch bedingten, zellulären Mechanismen noch besser zu verstehen. Der lentivirale Gentransfer bietet hier eine sichere Möglichkeit, isolierte HCMV-Proteine zu untersuchen.

So sollte die isolierte Auswirkung von IE2 auf die Enterokinase-Expression Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Darüber hinaus kann auch der

isolierte Einfluss von IE1 und IE2 auf Apoptose, Zellzyklus und Angiogenese noch detaillierter betrachtet werden. Auf Basis des im Rahmen dieser Arbeit erstellten Protokolls ist es nun möglich, die isolierte Auswirkung sowohl von IE1 und IE2 auf die Expression von Proteinen, welche an der Invasion und Migration beteiligt sind, näher zu untersuchen. Durch ein verbessertes Verständnis dieser Interaktion bieten sich für die Zukunft Möglichkeiten, die mit HCMV assoziierten malignen Erkrankungen effektiver und selektiver zu therapieren und so das Outcome des Patienten maßgeblich positiv zu beeinflussen.

6 Zusammenfassung

HCMV ist ein Pathogen mit einer weltweit sehr hohen Prävalenz und stellt nach wie vor ein großes Problem für Immunsupprimierte (Transplantations- und AIDS-Patienten) und für ungeborene Kinder dar. Seine Pathogenese ist weiterhin nur unzureichend bekannt, eine Impfprophylaxe existiert nicht und es stehen nur wenige, unzureichende Medikamente zur Therapie zur Verfügung. Auch ein verstärkender Einfluss des Virus auf die Tumormalignität ist gezeigt. Aber die der viralen Onkomodulation zugrundeliegenden Mechanismen, insbesondere die Frage, wie und wann Tumorstadium und -invasion durch HCMV beschleunigt werden, bedürfen weiterer Aufklärung.

Die immediate early-Proteine IE1 und IE2 sind wichtige Regulatorproteine einer HCMV-Infektion – insbesondere IE1, welches einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression der Wirtszelle nimmt. Es wurde a-priori die Hypothese erstellt, dass über einen positiven Einfluss von IE1 auf die Enterokinaseexpression die Trypsin-vermittelte Tumordinvasion gefördert wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein effizientes, zuverlässiges Protokoll zur Herstellung IE1- und IE2-exprimierender Tumorzelllinien mit Hilfe von lentiviralem Gentransfer ausgearbeitet. Damit verbunden konnten zwei persistent-transduzierte humane Tumorzelllinien, U-251 MG^{IE1} und U-251 MG^{IE2}, mit hohen Expressionsraten etabliert werden. Weiter konnte im zweiten Teil der Arbeit, sowohl im Akutmodell als auch an persistent-transduzierten Zellen, gezeigt werden, dass die Enterokinaseexpression nicht im Zusammenhang mit der IE1-Expression steht.

Durch die Erarbeitung des Transduktions-Protokolls und die Etablierung der persistent-transduzierten humanen Tumorzelllinien ist es nun möglich, die isolierten Auswirkungen von IE1 und IE2 auf humane Tumorzellen zu untersuchen. Die Widerlegung der Hypothese über die Beeinflussung der Enterokinaseexpression durch IE1 liefert ein Erkenntnis, um die Mechanismen der erhöhten Tumordinvasion besser verstehen zu können. Insgesamt konnte durch diese Arbeit ein Beitrag geliefert werden, die durch HCMV verursachten onkomodulatorischen Effekte noch besser nachvollziehen zu können. Dies

wiederum kann künftig dazu dienen therapeutische Strategien, welche der Invasion und Metastasierung entgegen wirken, zu verbessern bzw. zu entwickeln.

7 Summary

HCMV is a pathogen with a high incidence worldwide. It poses a major problem to patients with immunosuppression (e.g. from organ transplantations or AIDS) and to the foetus. Currently its pathogenesis has not been fully delineated. There is no provision for prophylactic immunization with few drugs made available, none of which provide a satisfactory treatment. Furthermore, it has been demonstrated that the virus has an amplifying effect on tumor malignancy. The mechanisms underlying this viral oncomodulation – in particular the question on how and when tumor growth and invasion are accelerated by HCMV – requires further clarification.

The immediate-early proteins IE1 and IE2 are important regulatory proteins in HCMV infections. IE1, in particular, has a significant influence on gene expression in the host cell. The a-priori hypothesis of this work is that trypsin-dependent tumor invasion is promoted via an assumed positive influence of IE1 on the expression of enterokinase.

The first part of this work was dedicated to the elaboration of an efficient and reliable protocol for the production of IE1- and IE2-expressing lines of tumor cells by means of lentiviral gene transfer. Two persistently transduced lines of human tumor cells with high expression rates, U-251 MG^{IE1} and U-251 MG^{IE2}, were established in the process. Furthermore, in the second part of the work, it was demonstrated in both the acute model and the persistently transduced cells that the expressions of enterokinase and of IE1 were not correlated.

The elaboration of the transduction protocol and the establishment of the persistently transduced human tumor cell lines facilitates research on the isolated effects of IE1 and IE2 on human tumor cell lines. The rejection of the hypothesis of the influence of IE1 on the expression of enterokinase facilitates a better understanding of the mechanisms of tumor invasion. Overall this work contributes towards a better understanding of the oncomodulatory effects of HCMV. This in turn may be useful in improving or developing future therapeutic strategies against invasion and dissemination.

8 Literaturverzeichnis

1. Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U. *Molekulare Virologie*. 3., Aufl. Heidelberg, Neckar: Spektrum Akademischer Verlag; 2008.
2. Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM. Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface. *Virology*. 1992;191(1):387-395.
3. Compton T. Receptors and immune sensors: The complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends in Cell Biology*. 2004;2004(14):5-8.
4. Nyberg P, Ylipalosaari M, Sorsa T, Salo T. Trypsins and their role in carcinoma growth. *Experimental cell research*. 2006;312(8):1219-1228.
5. Speir E, Modali R, Huang ES, et al. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. 1994;265(5170):391-394.
6. Michaelis M., Doerr H W, Cinatl J. The story of human cytomegalovirus and cancer: Increasing evidence and open questions. *Neoplasia*. 2009;11(1):1-9.
7. Shenk T, Stinski M. *Human cytomegalovirus: Human Cytomegalovirus Genome*. Berlin: Springer; 2008. Current topics in microbiology and immunology; v. 325.
8. Fields, Bernard N, ed, Knipe, David M, ed, Howley, Peter M, ed, eds. *Virology.: Chapter 76. Cytomegaloviruses and Their Replication* Edward S. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001.
9. Wang X, Huong S, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang E. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature*. 2003;424(6947):456-461.
10. McVoy MA, Adler SP. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol*. 1994;68(2):1040-1051.
11. Radsak K, Eickmann M, Mockenhaupt T, et al. Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Archives of Virology*. 1996;141(3-4):557-572.
12. Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J. Virol*. 1999;73(6):4806-4812.

13. Khaiboullina SF, Maciejewski JP, Crapnell K, et al. Human cytomegalovirus persists in myeloid progenitors and is passed to the myeloid progeny in a latent form. *Br. J. Haematol.* 2004;126(3):410-417.
14. Söderberg-Nauclér C, Nelson JY. Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology.* 1999;42(5-6):314-321.
15. Paulus C, Nevels M. The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses.* 2009;1(3):760-779.
16. Mercorelli B, Sinigalia E, Loregian A, Palù G. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev. Med. Virol.* 2008;18(3):177-210.
17. Gawn JM, Greaves RF. Absence of IE1 p72 Protein Function during Low-Multiplicity Infection by Human Cytomegalovirus Results in a Broad Block to Viral Delayed-Early Gene Expression. *Journal of Virology.* 2002;76(9):4441-4455.
18. Yurochko AD, Kowalik TF, Huong SM, Huang ES. Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *Journal of Virology.* 1995;69(9):5391-5400.
19. Poma EE, Kowalik TF, Zhu L, Sinclair JH, Huang ES. The human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with the cellular p107 protein and relieves p107-mediated transcriptional repression of an E2F-responsive promoter. *Journal of Virology.* 1996;70(11):7867-7877.
20. Nevels M, Paulus C, Shenk T. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(49):17234-17239.
21. Castillo JP, Kowalik TF. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene.* 2002;290(1-2):19-34.
22. Shen Y, Zhu H, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(7):3341-3345.
23. Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *Journal of Virology.* 1995;69(12):7960-7970.

24. Ahn JH, Chiou CJ, Hayward GS. Evaluation and mapping of the DNA binding and oligomerization domains of the IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus using yeast one and two hybrid interaction assays. *Gene*. 1998;210(1):25-36.
25. Marchini A, Liu H, Zhu H. Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J. Virol.* 2001;75(4):1870-1878.
26. Speir E, Modali R, Huang E, et al. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science*. 1994;265(5170):391-394.
27. Sommer MH, Scully AL, Spector DH. Transactivation by the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein requires a domain that binds to both the TATA box-binding protein and the retinoblastoma protein. *Journal of Virology*. 1994;68(10):6223-6231.
28. Hagemeyer C, Caswell R, Hayhurst G, Sinclair J, Kouzarides T. Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein. *The EMBO journal*. 1994;13(12):2897-2903.
29. Müller-Esterl W. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl; 2011.
30. Schwartz R, Helmich B, Spector DH. CREB and CREB-binding proteins play an important role in the IE2 86-kilodalton protein-mediated transactivation of the human cytomegalovirus 2.2-kilobase RNA promoter. *Journal of Virology*. 1996;70(10):6955-6966.
31. Bryant LA, Mixon P, Davidson M, Bannister AJ, Kouzarides T, Sinclair JH. The human cytomegalovirus 86-kilodalton major immediate-early protein interacts physically and functionally with histone acetyltransferase P/CAF. *Journal of Virology*. 2000;74(16):7230-7237.
32. Cherrington JM, Khoury EL, Mocarski ES. Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site. *Journal of Virology*. 1991;65(2):887-896.
33. Brinkmann MM, Dağ F, Hengel H, Messerle M, Kalinke U, Čičin-Šain L. Cytomegalovirus immune evasion of myeloid lineage cells. *Medical microbiology and immunology*. 2015;204(3):367-382.
34. Knowles WA. In-vitro cultivation of human cytomegalovirus in thyroid epithelial cells. *Archives of Virology*. 1976;50(1-2):119-124.

35. Tumilowicz JJ, Gawlik ME, Powell BB, Trentin JJ. Replication of cytomegalovirus in human arterial smooth muscle cells. *Journal of Virology*. 1985;56(3):839-845.
36. Lathey JL, Wiley CA, Verity MA, Nelson JA. Cultured human brain capillary endothelial cells are permissive for infection by human cytomegalovirus. *Virology*. 1990;176(1):266-273.
37. Yurochko AD, Miller WE, eds. *Human cytomegaloviruses: Methods and protocols*. New York: Humana Pr; 2014. Springer protocols; 1119.
38. Spiller OB. Development of a model for cytomegalovirus infection of oligodendrocytes. *Journal of General Virology*. 1997(78):3349–3356.
39. Ogura T, Tanaka J, Kamiya S, Sato H, Ogura H, Hatano M. Human Cytomegalovirus Persistent Infection in a Human Central Nervous System Cell Line: Production of a Variant Virus with Different Growth Characteristics. *Journal of General Virology*. 1986;67(12):2605-2616.
40. Gonczol E, Andrews P, Plotkin S. Cytomegalovirus replicates in differentiated but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Science*. 1984;224(4645):159-161.
41. Matsunaga S, Uchide N, Shono M, Ohyama K, Takeichi M, Toyoda H. Differences in Permissive Cytomegalovirus Infection between Primary Cultured Human Fetal Membrane Chorion and Amnion Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2013;36(11):1715-1721.
42. Compton T. An immortalized human fibroblast cell line is permissive for human cytomegalovirus infection. *Journal of Virology*. 1993;67(6):3644-3648.
43. Speer CP, Gahr M. *Pädiatrie: Solide Tumore*. 4., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Imprint: Springer; 2013. SpringerLink : Bücher.
44. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2006.
45. Prof. Dr. med. T. Klingebiel. Lymphome und Neuroblastome. Vorlesung Pädiatrie SS14; May 28, 2014; Frankfurt.
46. Cinatl J, Vogel JU, Rabenau H, Kornhuber B, Doerr HW. Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology*. 1996;39(4):259-269.

47. Cinatl J, Vogel JU, Kotchetkov R, et al. Persistent human cytomegalovirus infection induces drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1998;58(2):367-372.
48. Hiddemann W, Bartram CR. *Die Onkologie*. Berlin: Springer; 2010.
49. Bühling KJ, Lepenies J, Witt K. *Intensivkurs Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 4., aktualisierte Aufl. München u.a: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
50. Söderberg-Nauclér C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;41(3):218-223.
51. Harkins L, Volk AL, Samanta M, et al. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *The Lancet*. 2002;360(9345):1557-1563.
52. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer research*. 2002;62(12):3347-3350.
53. Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *The Journal of urology*. 2003;170(3):998-1002.
54. Priel E, Wohl A, Teperberg M, Nass D, Cohen ZR. Human cytomegalovirus viral load in tumor and peripheral blood samples of patients with malignant gliomas. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2015;22(2):326-330.
55. Scheurer ME, Bondy ML, Aldape KD, Albrecht T, El-Zein R. Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas. *Acta neuropathologica*. 2008;116(1):79-86.
56. Cinatl J, Scholz M, Kotchetkov R, Vogel J, Wilhelm Doerr H. Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends in Molecular Medicine*. 2004;10(1):19-23.
57. Cinatl J, Vogel J, Kotchetkov R, Wilhelm Doerr H. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS microbiology reviews*. 2004;28(1):59-77.

58. Cinatl J, Vogel JU, Kotchetkov R, et al. Persistent human cytomegalovirus infection induces drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer research*. 1998;58(2):367-372.
59. Tanaka K, Zou J, Takeda K, et al. Effects of Human Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins on p53-mediated Apoptosis in Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation*. 1999;99(13):1656-1659.
60. Blaheta RA, Beecken W, Engl T, et al. Human cytomegalovirus infection of tumor cells downregulates NCAM (CD56): a novel mechanism for virus-induced tumor invasiveness. *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 2004;6(4):323-331.
61. Scholz M, Blaheta RA, Wittig B, Cinatl J, Vogel J, Doerr HW. Cytomegalovirus-infected neuroblastoma cells exhibit augmented invasiveness mediated by beta1alpha5 integrin (VLA-5). *Tissue Antigens*. 2000;55(5):412-421.
62. Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, Zhang W, Kraus MH. Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity. *Cancer research*. 2008;68(3):724-730.
63. Koolman J, Röhm K. *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme; 2009.
64. Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R, et al. Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2003;22(2-3):237-258.
65. Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer research*. 1992;52(18):5046-5053.
66. Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, et al. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *The American journal of pathology*. 1998;153(3):937-944.
67. Miyata S, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyazaki K. Trypsin stimulates integrin alpha(5)beta(1)-dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(7):4592-4598.
68. Hoever G, Vogel J, Lukashenko P, et al. Impact of persistent cytomegalovirus infection on human neuroblastoma cell gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;326(2):395-401.

69. Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
70. Clontech Laboratories I. Tet-Off® and Tet-On® Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User Manual. Published 2012. Available at: <http://www.clontech.com>.
71. Knoblach T, Grandel B, Seiler J, Nevels M, Paulus C. Human cytomegalovirus IE1 protein elicits a type II interferon-like host cell response that depends on activated STAT1 but not interferon- γ . *PLoS pathogens*. 2011;7(4):e1002016.
72. THERESA KNOBLACH. *Das Cytomegalievirus IE1-Protein als Regulator des humanen Transkriptoms und Zielstruktur RNAi-basierter Therapiestrategien*. [Dissertation]. Regensburg: Universität Regensburg; 2010.
73. *Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe retroviraler Vektoren: AZ.6790-10-41; Nov/2011*.
74. Castillo JP, Frame FM, Rogoff HA, Pickering MT, Yurochko AD, Kowalik TF. Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. *Journal of Virology*. 2005;79(17):11467-11475.
75. Poland SD, Costello P, Dekaban GA, Rice, G. P. A. Cytomegalovirus in the Brain: In Vitro Infection of Human Brain-Derived Cells. *Journal of Infectious Diseases*. 1990;162(6):1252-1262.
76. Spector DH. Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology*. 1996;39(5-6):361-377.
77. Wolff D, Sinzger C, Drescher P, Jahn G, Plachter B. Reduced levels of IE2 gene expression and shutdown of early and late viral genes during latent infection of the glioblastoma cell line U138-MG with selectable recombinants of human cytomegalovirus. *Virology*. 1994;204(1):101-113.
78. Wagener C. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3., komplett aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010.

79. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Vierte, korrigierte und aktualisierte Auflage. Springer-Lehrbuch.
80. Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus tropism for endothelial cells: not all endothelial cells are created equal. *Journal of Virology*. 2007;81(5):2095-2101.
81. Hendrix MG, Dormans PH, Kitslaar P, Bosman F, Bruggeman CA. The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. *American Journal of Pathology*. 1989;134(5):1151-1157.
82. Caposio P, Musso T, Luganini A, et al. Targeting the NF-kappaB pathway through pharmacological inhibition of IKK2 prevents human cytomegalovirus replication and virus-induced inflammatory response in infected endothelial cells. *Antiviral research*. 2007;73(3):175-184.
83. Bentz GL, Jarquin-Pardo M, Chan G, Smith MS, Sinzger C, Yurochko AD. Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *Journal of Virology*. 2006;80(23):11539-11555.
84. Streblow DN, Dumortier J, Moses AV, Orloff SL, Nelson JA. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. *Current topics in microbiology and immunology*. 2008;325:397-415.

9 Anhang

9.1 Original Western-Blot-Banden

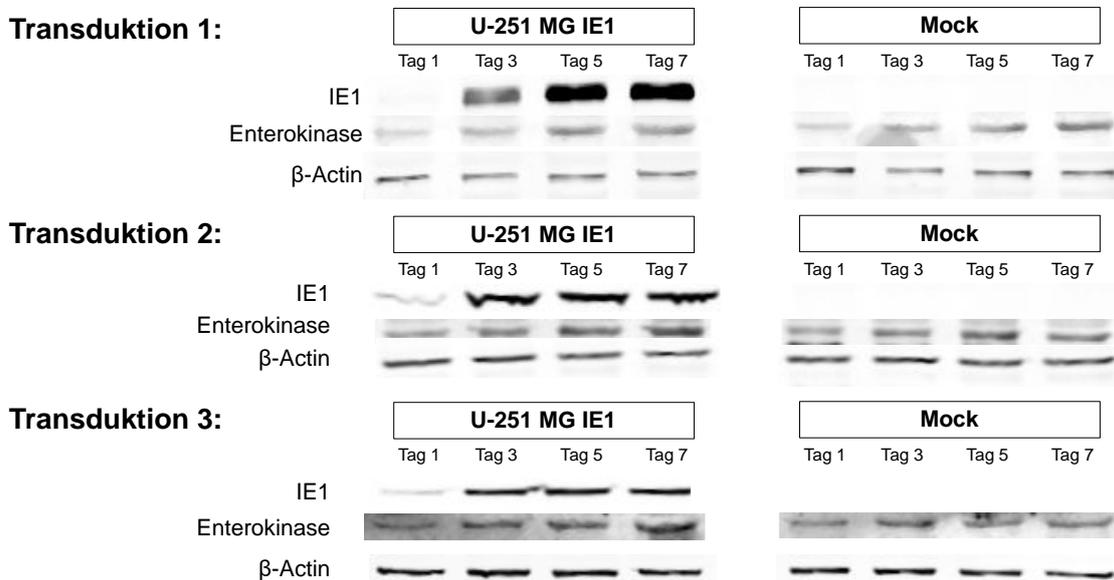


Abbildung 51: Western Blot-Banden drei unabhängiger Transduktionen 1, 3, 5 und 7d p.t.; mit Antikörper gegen IE-, Enterokinase- und β-Actin-Antigen behandelt; **U-251 MG^{IE1}** : IE1 transduzierte U-251 MG; **MOCK** : U-251 MG MOCK; die in Abbildung 31 bis Abbildung 44 aufgeführten relativen Proteinmengen wurden aus diesen Western Blots ermittelt

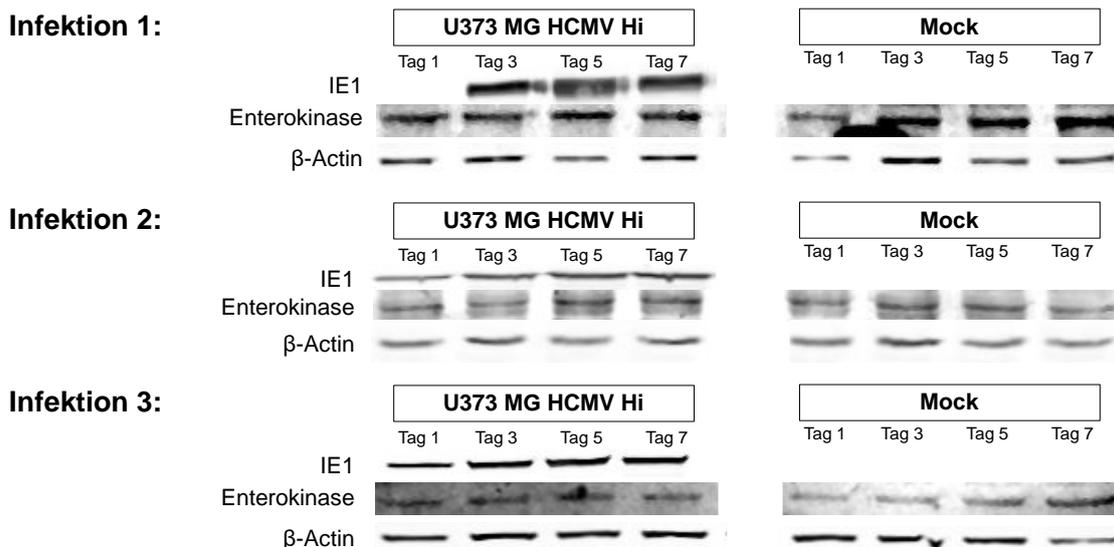


Abbildung 52: Western Blot-Banden drei unabhängiger Infektionen 1, 3, 5 und 7d p.i.; mit Antikörper gegen IE-, Enterokinase- und β-Actin-Antigen behandelt; **U-251 MG^{Hi91}** : mit HCMV-Hi9191 Vollvirus infizierte U-251 MG; **MOCK**: U-251 MG MOCK; die in Abbildung 31 bis Abbildung 44 aufgeführten relativen Proteinmengen wurden aus diesen Western Blots ermittelt

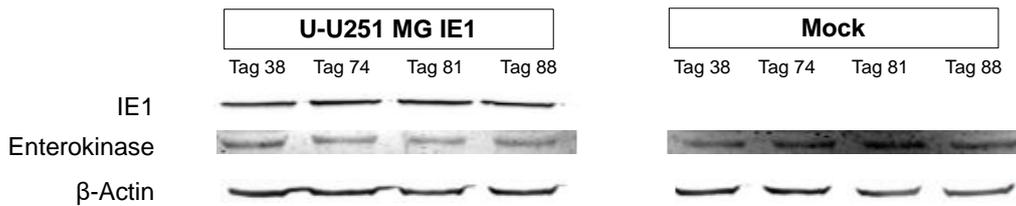


Abbildung 53: Western Blot-Banden der U-251 MG^{IE1} 38, 74, 81 und 88d p.t.; mit Antikörper gegen IE-, Enterokinase- und β -Actin-Antigen behandelt; **U-251 MG^{IE1}**: persistent –IE1 transduzierte U-251 MG; **MOCK**: U-251 MG MOCK; die unter Abbildung 46 bis Abbildung 48 aufgeführten relativen Proteinmengen wurden aus diesem Western Blots ermittelt

9.2 Dokumentation der IE1-Transduktion von UKF-NB-4 mit MOI 10,53

Die subkonfluenten Zellen wurden unter Schwenken mit einem MOI 10,53 für drei Stunden mit dem Konstrukt IE1 LV960 inkubiert und im Anschluss wurde die Lentiviren-Überstands-Lösung abgegossen, der Zellrasen zweimal mit 1xPBS gewaschen und mit 10 ml frischem Kulturmedium versorgt.

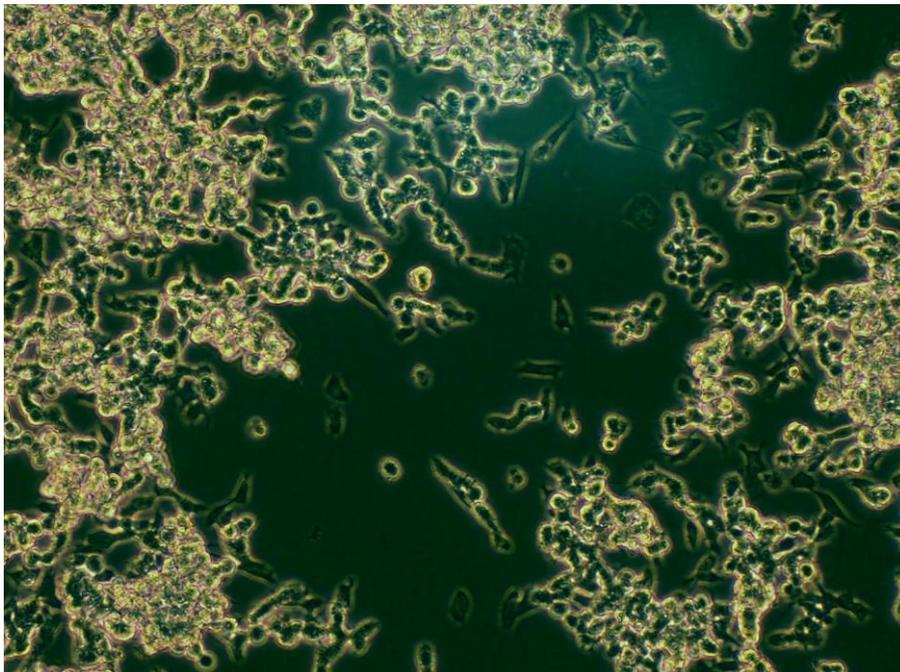


Abbildung 54: Lichtmikroskopische Aufnahmen von UKF-NB-4 p177 4h nach Transduktion mit IE1; 10x

9.3 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Volkhard A. J. Kempf, dem kommissarischen Direktor des Institutes für Medizinische Virologie, Herrn Prof. Dr. rer. nat. J. Cinatl für die Bereitstellung des Themas, Herrn Dr. phil. nat. Jens-Uwe Vogel und Herrn Dr. phil. nat. Florian Rothweiler für die wissenschaftliche Betreuung.

Weiterhin danke ich dem Verein "Hilfe für krebskranke Kinder, Frankfurt/Main e.V." bzw. der "Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder e.V." für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit und die Bereitstellung der Räumlichkeiten.

Große Dankbarkeit empfinde ich gegenüber Herrn Dr. med., PhD Jaroslav Cinatl und Frau Gesa Meincke, welche mich das „Schwimmen“ in dieser Art von Labor gelehrt haben, mir neben dem Fachwissen eine unglaubliche Fülle an nützlichem Wissen vermittelten und ohne deren Gesellschaft ich mich an so manchem Labortag sehr einsam gefühlt hätte.

Auch danke ich Herrn Willi Bosserhoff für die müßige Arbeit des letzten Korrekturlesens, Mrs. Kimi Rund M.D. für die Korrektur der englischen Zusammenfassung und Frau cand. med. Alexandra Lucaciu für aufrichtige Kritik, Lob und Korrektur.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Volker W. Bosserhoff für die maßlose Geduld mit mir während der Erstellung dieser Arbeit, produktiven Diskussionen, gutmütigem Korrekturlesen und hilfreichen Formatierungs- und Excel-Unterweisungen.

Frankfurt am Main, im Dezember 2015

9.4 Lebenslauf

9.5 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Etablierung eines Modells mit lentiviralen Vektoren
zur Untersuchung der onkomodulatorischen Effekte
der immediate-early-Proteine IE1 und IE2
des humanen Cytomegalovirus“**

am Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Jindrich Cinatl mit Unterstützung durch die Herren Dr. Jens-Uwe Vogel und Dr. Florian Rothweiler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Leonie Rhein)