Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und medizinische Mikrobiologie Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk Institut für Zytobiologie und Zytopathologie

Leiter: Prof. Dr. R. Lill

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

Untersuchungen zum Kerntransport von Phosphoprotein pp65 in HCMV infizierten menschlichen Fibroblasten

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Kerstin Bringezu- Schröder, geborene Bringezu aus Köthen

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am 10. Mai 2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. H. F. Kern
Correferent: Prof. Dr. R. Jakob

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Klinische Aspekte	2
1.3 Virusstruktur	3
1.4 Virale Proteine	6
1.5 Infektion und Replikation	6
1.6 Morphogenese und Reifung	9
1.7 Transport- und Reifungsknospung	11
1.8 Tegumentproteine	13
1.9 Fragestellung	15
2 Material	16
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien	18
2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	20
2.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur	22
2.5 Enzyme, Antibiotika, Marker, Standards und Isotope	23
2.6 Verwendete Antikörper	24
3 Methoden	25
3.1 Gelelektrophoretische Analyse der Proteine	25
3.1.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-	25
PAGE)	
3.1.2 Proteinfällung nach Wessel	28
3.1.3 Silberfärbung nach Hempelmann	29
3.1.4 Western- Blot- Analyse von Proteinen	30
3 1 4 1 Semidry- Blot- Verfahren	31

Inhaltsverzeichnis II

3.1.4.2 Naß- Blot- Verfahren	32
3.1.4.3 Immunreaktion	33
3.1.4.4 Einsatz der Antikörper	35
3.1.5 Proteinbestimmung	35
3.1.5.1 Lösungen für die TCA- Fällung	36
3.1.5.2 Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry	37
3.1.5.3 Lösungen des Bicinchoninsäure- Assays	37
3.2 Zellkultur	39
3.2.1 Medien und Lösungen	39
3.2.2 Kultivierung	39
3.3 Virus und Infektion	40
3.3.1 Virus-Stamm	40
3.3.2 Bestimmung des Virus- Titers	40
3.3.3 Gewinnung eines infektiösen Virusstocks	42
3.3.4 Experimentelle HCMV- Infektion von HFF-Zellen	43
3.4 Zellfraktionierung	44
3.5 Immunpräzipitation	48
3.5.1 Zellfraktionierung für die Materialgewinnung zur	48
Immunpräzipitation	
3.5.2 Bestimmung der säuregefällten Radioaktivität	50
3.5.3 Herstellung der 1:1 Protein-A-Sepharose-Suspension	50
3.5.4 Immunpräzipitation aus Zellfraktionen	51
3.6 Transfektion	53
3.7 Elektronenmikroskopie	54
4 Ergebnisse	58
4.1 Standardisierung der Zellfraktionierung von HFF-Zellen	58
4.1.1 Modifikation der Zellfraktionierung	58
4.1.2 Morphologische Analyse der Zellfraktionierung	63
4.1.2.1 Lichtmikroskopische Analyse der Zellfraktionen	63
4.1.2.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Zellfraktionen	67
4.1.3 Biochemische Analyse der Zellfraktionierung	72
4.1.4 Immunologischer Nachweis des Tegumentproteins pp65 in	75

Inhaltsverzeichnis III

HCMV- infizierten HFF-Zellen	
4.2 Untersuchungen zur Kinetik des pp65 in pulse- chase Experimenten	77
4.2.1 Standardisierung der Versuchsbedingungen	78
4.2.1.1 Verschiedene Puffer zur Immunpräzipitation	78
4.2.1.2 Der optimale Temperaturausgleich in	78
Gewebekulturflaschen	
4.2.1.3 Wieviel Radioaktivität ist für die Pulse-Markierung nötig	80
4.2.2 Immunpräzipitation von pp65	81
4.2.2.1 Graphische Darstellung des relativen Kernanteils an pp65	88
in Abhängigkeit von der Chase-Zeit	
4.3 Transfektionsversuche mit pp65	90
5 Diskussion	93
5.1 Das Tegumentprotein pp65	93
5.2 Standardisierung der Zellfraktionierung und des puls- chase-	95
Systems mit in vitro infizierten primären menschlichen Fibroblasten	
5.3 Transfektionsversuche mit pp65-ein alternativer in vivo-	98
Versuchsansatz zur Untersuchung der Kinetik von pp65	
5.4 Mögliche Funktionen von pp65	99
6 Zusammenfassung	101
7 Abkürzungsverzeichnis	103
8 Literaturverzeichnis	106
9 Anhang	114
Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	114
Danksagung	116

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) gehört zur Familie der Herpesviren. Hierzu werden Virus-Subfamilien gezählt, welche gemeinsame Charakteristika in ihrer Struktur aufweisen. Dazu zählen die lineare doppelsträngige DNA, das Kapsid, die Matrix und die umhüllende Membran.

Die Herpesviren wurden gemäß ihrer unterschiedlichen biologischen Eigenschaften durch das "International Commitee on the Taxonomie of Viruses" (ICTV) in 3 Untergruppen, die α ,- β -und γ -Herpesviren eingeteilt. (Roizman, 1993)

Zu den Charakteristika der α-Herpesviren, zu denen das Herpes simplex Virus (HSV) gehört, zählen ein schnelles in vitro Wachstum, eine breite Wirtsspezifität, ein kurzer Replikationszyklus und ein schnelles Zerstören der infizierten Zelle.

Die γ -Herpesviren, wie das Epstein Barr Virus (EBV), weisen eine hohe Spezifität zu lymphoiden Zellen auf.

Das Cytomegalievirus (humanes Herpesvirus-5) stellt den Prototyp der β-Herpesviren-Subfamilie dar. Zu dieser Gattung zählende Viren haben eine enge Wirtsspezifität, einen langen Replikationszyklus und weisen sich durch ein langsames Wachstum in der Zellkultur aus. Durch Cytomegalieviren infizierte Zellen weisen morphologische Veränderungen auf. Diese werden als zytopathischer Effekt bezeichnet und äußern sich in nukleären und zytoplasmatischen Einschlußkörperchen, wobei die gesamte Zelle stark vergrößert ist (Cytomegalie).

1881 beschrieb Ribbert zum ersten mal diese Einschlußkörper in Zellen. Goodpasteure und Talbert waren die Ersten, welche bereits 1921 annahmen, daß die Cytomegalie durch eine virale Infektion verursacht wird. Von Weller et al. wurde 1960 der Begriff Cytomegalievirus vorgeschlagen, um den durch dieses Virus induzierten zytopathischen Effekt wiederzuspiegeln (Riley, 1997).

1.2 Klinische Aspekte

Das einzige Reservoir des HCMV ist der Mensch. Die Errergerübertragung erfolgt als Tröpfehen- oder Kontaktinfektion.

Es wird die Erstinfektion (Infektion seronegativer Personen) von der rekkurierenden Infektion unterschieden. Hierbei kommt es zur endogenen Reaktivierung einer latenten Infektion oder zur Reinfektion.

Infektionsquellen sind Speichel, Urin, Vaginal- und Cervicalsekret, Sperma, Muttermilch, Tränenflüssigkeit, Fäzes und Blut infizierter Personen.

Das HCMV ist ein weltweit verbreitetes Virus. Die Prävalenz bei Erwachsenen liegt zwischen 40 bis 100%, je nach sozioökonomischen Bedingungen. In Mitteleuropa beträgt die durchschnittliche Durchseuchung 50%, in Ländern der dritten Welt ca. 90%. Die Infektionsrate steigt während der Kindheit, 10 bis 20% der Kinder sind HCMV- positiv vor Erreichen der Pubertät (de Jong et al., 1998).

Nach erfolgter Primärinfektion persistiert das Virus in latenter Form im Organismus. Die endogene Reaktivierung insbesondere bei Immunsuppression ist, wie bei jedem anderen Herpesvirus, jederzeit möglich. Aufgrund der Antigenitätsvielfalt des HCMV ist auch eine Neuinfektion möglich (Roizman, 1993).

Das Ausmaß der Zell- und Gewebsschädigung bei der Primärinfektion ist insbesondere vom Immunstatus und dem Alter des Infizierten abhängig.

Die Zielzellen der viralen Replikation während der akuten Infektion sind epitheliale Zellen unterschiedlicher Gewebe, einschließlich der Speicheldrüsen, der Niere, der Endothelzellen und der Fibroblasten.

Der Immunstatus ist eine wichtige Determinante bei der Ausbreitung des HCMV in den unterschiedlichen Geweben. Bei Immunkompetenten sind vorwiegend die duktalen Epithelzellen betroffen und es kommt in der Regel zum subklinischen Verlauf der Infektion (der HCMV- Mononukleose). Immunsupprimierte zeigen eine disseminierte Ausbreitung und es liegt eine erhöhte Morbidität und Mortalität primärer und rekurrierender Infektionen vor.

Die Populationen mit dem größtem Risiko für eine HCMV- Infektion- und Erkrankung sind Organtransplantierte, vor allem Nieren- (Klof, 1983) und Knochenmarktransplantierte (Rubin et al., 1979), Chemotherapiepatienten und AIDS Erkrankte (Roizman, 1993).

In den USA zeigen 1% der Lebendgeborenen eine kongenitale HCMV- Infektion. 5% von ihnen zeigen eine typische generalisierte "cytomegalic inclusion disease" (CID).

Bei diesem Krankheitsbild sind vergrößerte Zellen mit typischen intranukleären Einschlüssen nachweisbar. Diese typisch veränderten Zellen kommen bei ausgeprägtem Krankheitsbild disseminiert vor. Charakteristisch für die CID beim Neugeborenem ist weiterhin die Beteiligung des retikulo- endothelialen Systems (RES) und Zentralnervensystems (ZNS), oft mit Seh- und Hörstörungen verbunden. Dieses kongenitale Cytomegalie-Syndrom ist auf eine Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft zurückzuführen. 20 bis 30% dieser Kinder sterben in den ersten beiden Lebensjahren. Eine konnatale Infektion führt zum gehäuften Auftreten von Frühgeburten.

Zur Prophylaxe, insbesondere bei Risikopatienten, wie Nierentransplantierten steht ein passiver Impfstoff aus Hyperimmunglobulin zur Verfügung, der den Verlauf der Infektion bzw. Erkrankung bei seronegativen abschwächt. Seropositiven Transplantierten kann man zur Vermeidung einer HCMV- Erkrankung Ganciclovir applizieren (Simon, Stille 2000).

1.3 Virusstruktur

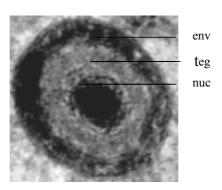


Abb.: 1.1: elektronenmikroskopische Aufnahme des humanen Cytomegalievirus (Vergrößerung 210000x) nach Freisetzung aus einer Zelle,

freundlicherweise von Prof. Dr. med. H.F. Kern zur Verfügung gestellt

env: envelope (Membranhülle)

teg: Tegument nuc: Nukleokapsid

Die genetische Information des Cytomegalievirus ist in einer linearen, doppelsträngigen DNA gespeichert, welche kondensiert im Inneren das elektronendichte Zentrum bildet. Dieses ist von einem Proteinmantel, dem ikosaedrischen Kapsid umgeben, das einen Durchmesser von 100 nm mißt und aus 162 Kapsomeren besteht. Die DNA und das Kapsid werden zusammen als Nucleokapsid bezeichnet.

Zwischen Virushülle und Kapsid befindet sich eine Struktur, die als Matrix oder von Roizman und Furlong (Roizman,1993) als Tegument bezeichnet wird. Das Tegument beinhaltet Proteine, die Größe ist variabel und scheint von der Lokalisation des Virus in der infizierten Zelle abhängig zu sein.

Die Hülle des Virus besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in der zahlreiche Glykoproteine verankert sind.

Der Gesamtdurchmesser des HCMV beträgt 160 bis 200 nm.

Elektronenmikroskopisch können drei verschiedene Arten von Kapsiden unterschieden werden: Typ A- Kapside enthalten keine DNA und erscheinen elektronenmikroskopisch als leere Strukturen. B- Kapside enthalten ebenfalls keine DNA, sind noch nicht umhüllt, bestehen vor allem aus Kapsidproteinen, auf die später noch eingegangen wird, sie werden im Zellkern gefunden. Die C- Kapside enthalten DNA, dadurch weisen sie einen elektronendichten Kern auf und imponieren als gefüllte Struktur (Rixon, 1993; Mocarski, 1993), sie sind umhüllt.

Neben dieser Kapside werden von cytomegalievirusinfizierten Zellen zwei weitere Viruspartikel produziert und freigegeben, nämlich die sogenannten dense bodies (DBs) (Sarov und Abady, 1975) und non- infectious enveloped particles (NIEPs) (Irmiere und Gibson, 1983). Die NIEPs haben eine vergleichbare Morphologie zum Virus, sie sind umhüllt beinhalten aber keine DNA. Die DBs werden in ebenso großen Mengen wie das Virus gebildet. In der infizierten Zelle überwiegen sie im Zytoplasma. Sie besitzen kein Nukleokapsid, sind wie das Virus von einer Membran umhüllt und bestehen aus einem unterschiedlich großen Aggregat von Tegumentproteinen. Den größten Anteil hieran (95%) hat das pp65 (Irmiere und Gibson, 1983).

Das Genom des humanen Cytomegalievirus ist mit 230 kb das größte der Herpesviren. Die Genome der Herpesviren werden je nach Sequenzanordnung in sechs Klassen eingeteilt. Das HCMV besitzt ein Klasse E Genom. Hierbei sind ein

langes (UL) und ein kurzes (US) nicht repetetives Segment von invertierten repetitiven Abschnitten, b (TR_L und IR_L) und c (TR_S und IR_S) genannt, flankiert. An beiden Enden des Genoms und in invertierter Orientierung zwischen UL und US befindet sich die Sequenz a. Die Segmente UL und US können in beiden Orientierungen zueinander stehen, somit ist die Bildung von vier Isoformen möglich. Die Anzahl der a Sequenzen ist in den verschiedenen HCMV Stämmen variabel.

Vom HCMV- Laborstamm AD169 wurde das Genom vollständig aufgeschlüsselt (Bankier et al., 1991a). Es besteht aus 208 offenen Leserahmen (ORFs), die für mehr als 100 Proteine kodieren (Chee et al., 1990). Synthetisierte Proteine werden nach einer einheitlichen Nomenklatur (Landini & Spaete, 1993) beschrieben, wobei ihr Leserahmen und eine nähere Charakterisierung des Proteins angegeben werden. So steht die Bezeichnung ppUL83 für ein Phosphoprotein, welches vom 83. Leserahmen auf Segment UL kodiert wird.

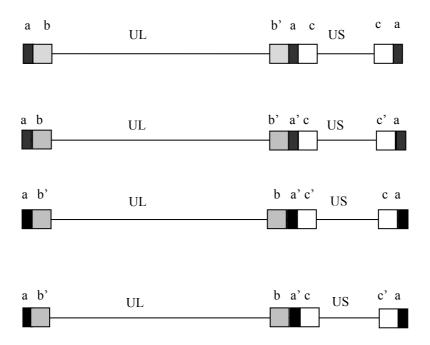


Abb.:1.2: Schematische Darstellung des HCMV- Genoms mit seinen 4 Isoformen, durch Inversion von US, UL und US sowie UL.

1.4 Virale Proteine

Infektiöse Viren beinhalten mehr als 30 Polypeptide, deren molekulare Massen zwischen 20 bis über 200 kDa betragen (Kim et al., 1976). Diese sind verteilt im Kapsid, im Tegument und in der Hülle.

Das Kapsid besteht vornehmlich aus 4 Proteinen (Baldick und Schenk, 1996), dem großen (pUL86, 150 kDa), dem kleinen (pUL46, 34 kDa) und dem kleinsten (10-12kDa) Kapsidprotein, sowie dem "Assembly"- Protein (UL80, 36kDa).

In der Hülle befinden sich mindestens 8 Glykoproteine. Bisher sind mit Sicherheit 4 Proteine in der Hülle identifiziert und ORF's zugeordnet wurden (Spaete et al., 1994): gB (gpUL55), gH (gpUL75), gM (gpUL100) und gp48 (gpUL4).

Das Tegument beinhaltet mehr als 20 Proteine, von denen die meisten phosphoryliert sind. Hierzu gehören: pp150 (UL32), pp65 (UL83), pp71(UL82) und pp28 (UL99).

1.5 Infektion und Replikation

Die Infektion einer Zelle mit dem humanen Cytomegalievirus wird durch die Bindung des HCMV an Heparansulfate eingeleitet, die sich an der Zelloberfläche der Wirtszelle befinden (Compton et al., 1993). Die Effizienz der Penetration in die Wirtszelle ist abhängig vom Vorhandensein spezieller Rezeptoren. Dies sind zelluläre Membranglykoproteine mit einer Größe von etwa 30 kDa (Tayler & Cooper, 1990) und 92 kDa (Keay et al., 1989). Virale Proteine, welche die Bindung zur Wirtszelle vermitteln, scheinen die Glykoproteine gB und gH (Keay & Baldwin 1991; Kari & Gehrz 1992) zu sein. Insbesondere das Vorhandensein einer fusogenen Domäne des Glykoproteins gB macht dessen Beteiligung an der Fusion sehr wahrscheinlich (Bold et al., 1996).

Das Eindringen des HCMV in die Wirtszelle erfolgt pH- unabhängig durch Fusion der viralen Hülle mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle (Compton et al., 1992). Die Nucleokapside erreichen schnell die Kernhülle und setzen die virale DNA frei, die in den Kern gelangt (Sodeik et al., 1997).

Über die Freisetzung der Nukleinsäuren in den Zellkern der Wirtszelle ist erst wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Tegumentbestandteile und die

Nukleinsäuren des infizierenden Virus in weniger als einer Stunde in den Zellkern transportiert werden.

Die Replikation und Transkription der Cytomegalieviren findet wie bei allen Herpesviren im Kern der infizierten Zelle statt. Dies verlangt den Transport vieler viraler Proteine von ihrem Syntheseort im Zytoplasma zum Zellkern.

Die Expression der viralen Gene erfolgt koordiniert und kann in 3 Phasen gegliedert werden: in die sehr frühe (immediate early, IE), in die frühe (early, E) und in die späte (late) Phase. Regulierend auf diesen kaskadenartigen Ablauf wirken jeweils die Produkte der vorangegangenen Expressionsphase.

In der sehr frühen Phase werden die α -Gene exprimiert. Diese unterliegen der Kontrolle des starken major- immediate early promotor- enhancers (MIEP; Stamminger & Fleckenstein, 1990). Der MIEP wird durch das Tegumentprotein pp71 und durch andere zelluläre Faktoren transaktiviert (Liu & Stinski, 1992). Die Transkription erfolgt unabhängig von der viralen Proteinsynthese und beginnt unmittelbar nach Infektion der Wirtszelle. Die α -Gen Produkte IE1- und IE2-Proteine aktivieren Gene der nachfolgenden Expressionsphasen.

Die Erstellung der β- Transkripte erfolgt in der frühen Phase und beginnt etwa 4 Stunden post infektionem. Die Produkte der frühen Phase wirken ebenfalls regulierend auf die virale Genexpresion, den Wirtszellmetabolismus und auf die DNA- Replikation. Zu den frühen Genen gehören unter anderem die virale DNA-Polymerase (UL54), der Prozessivitätsfaktor pp52 (UL44) und das ss- DNA bindende Protein (UL57).

Etwa 12 Stunden post infektionem beginnt die Produktion der γ -Gen kodierten Proteine mit der Untergruppe der γ_1 -Gene. Die γ_1 -Transkripte werden auch dann synthetisiert, wenn die DNA- Replikation gehemmt wird, allerdings in reduziertem Maß, im Gegensatz zu den γ_2 -Genen. Die Expression der γ_2 - Gene beginnt etwa 24 Stunden post infektionem. Die Proteinsynthese der γ_2 - Produkte ist abhängig von der stattfindenden viralen DNA- Replikation. Die meisten γ - Gene kodieren für Strukturproteine.

Sehr schnell nach Infektion der Wirtszelle zirkularisiert das lineare Genom des HCMV. Es bildet sich ein Concatamer, welches anschließend in Einzeleinheiten gespalten wird. Das HCMV kodiert alle für die Replikation notwendigen Proteine.

Der Replikationszyklus der Zytomegalieviren ist im Vergleich zu anderen Herpesviren mit bis zu 72 Stunden für den humanen Typ eher langsam. Neue Virionen akkumulieren in infizierten Zellen ab 48 Stunden post infektionem, eine massenweise Freisetzung von infektiösen Viren erfolgt etwa 72 Stunden nach Infektion. Ab diesem Zeitpunkt können die HCMV- Proteinsynthese, die DNA-Replikation und die Virusproduktion für länger als eine Woche auf einem konstant hohem Niveau gehalten werden.

In infizierten humanen Fibroblasten ist die HCMV- Replikation 14-16 Stunden post infektionem nachweisbar.

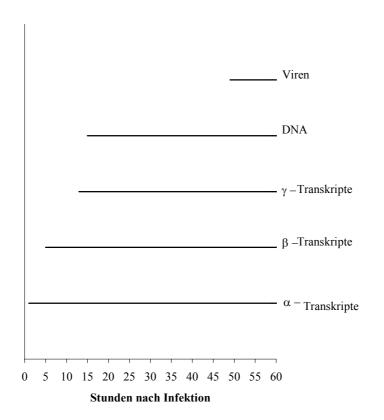


Abb.: 1.3.: Darstellung der Expressionsphasen in Abhängigkeit von der Zeit nach Infektion (p. i.). Die DNA- Replikation ist ab etwa 14 Stunden p. i. detektierbar. Der Nachweis reifer Viren gelingt ab 48 Stunden p. i., das Maximum ist zwischen 72-96 Stunden p. i. zu verzeichnen, dann bleibt die Virusproduktion für länger als 1 Woche auf einem konstant hohem Level.

Das HCMV weist ein sehr enges Wirtsspektrum in vitro auf, obwohl in vivo eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen infiziert werden können. Die virale Replikation des HCMV ist in primären differenzierten humanen Zellen möglich. Die höchste Replikationsaktivität wird in primären differenzierten humanen Fibroblasten erreicht, die von fetalen Geweben, vor allem der Haut und der Lunge isoliert werden. In anderen permissiven Zellinien, wie in Astrozytoma- Zellen, findet die virale Replikation auf einem im Vergleich niedrigerem Niveau statt.

Die Ursache nicht permissiver Zellen scheint in der eingeschränkten Expression viraler Gene in undifferenzierten Zellen zu liegen.

1.6 Morphogenese und Reifung

Die Morphogenese des humanen Cytomegalievirus beginnt im Zellkern infizierter Zellen, mit dem Aufbau des Kapsids.

Wie zuvor beschrieben werden A-, B- und C-Kapside unterschieden.

Diese Bezeichnung basiert ursprünglich auf ihre Reinigungsmethoden (Gibson und Roizman, 1972).

Die leer erscheinenden A- Kapside besitzen keinen inneren Proteinring und sind bis auf das fehlende "Assembly"- Protein wie die B- Kapside zusammengesetzt. Die A- Kapside scheinen eine Zwischenstufe nach Abbau der inneren Ringstruktur der B- Kapside und vor Inkooperation der DNA darzustellen.

Die B- Kapside sind die erste Erscheinungsform. Sie weisen morphologisch eine innere und eine äußere Kapsel auf. Die äußere Kapsel besteht vornehmlich aus den vorgenannten Kapsidproteinen: dem großen (pUL86, 150kDa), dem kleinen (pUL46, 34kDa) und dem kleinsten (10-12kDa) Kapsidprotein. Die innere Kapsel besteht aus dem "Assembly"- Protein (UL80, 36kDa). Weiterhin beinhalten die B- Kapside die Serin- Protease Assemblin (Welch et al., 1991). Eine spezifische Interaktion zwischen dem "Assembly"- Protein und dem großen Kapsidprotein konnte in vitro gezeigt werden (Wood, 1997).

Das "Assembly"- Protein ist in den Pre B- Kapsiden ungespalten, diese Kapsidgruppe wird als Vorstufe der B- Kapside angesehen. Während der Maturation wird das "Assembly"- Protein durch die Serin- Protease Assemblin gespalten. Die

Spaltprodukte werden entfernt und die virale DNA wird in das jetzt leere Kapsid eingepackt. Diese DNA- haltigen Kapside werden als C-Kapside bezeichnet.

Die NIEPs beinhalten, wie bereits beschrieben, keine DNA, aber das "Assembly"-Protein. Auf Grund der fehlenden DNA und dem Vorliegen des "Assembly"-Proteins kann darauf geschlossen werden, dass sich diese Partikel aus nicht gereiften B- Kapsiden ableiten.

Die C- Kapside werden in einem als Transportknospung bezeichneten Prozeß aus dem Zellkern freigesetzt.

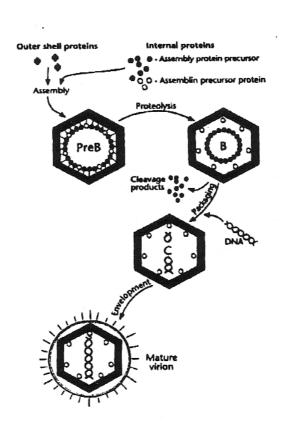


Abbildung: 1.4: Kapsidmorphogenese (nach Gibson, 1996) s. Text

1.7 Transport- und Reifungsknospung

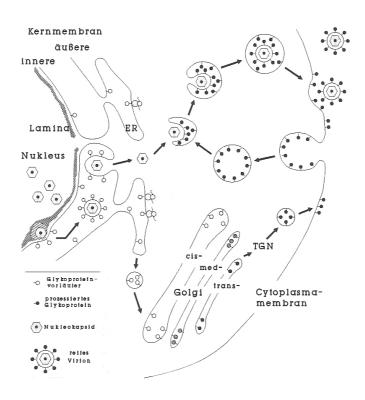


Abb.: 1.5: schematische Darstellung zur Transport- u. Reifungsknospung

Nach abgeschlossener Kapsidmorphogenese im Kern infizierter Zellen verlassen die Kapside diesen und erwerben in der Wirtszelle das Tegument und die Hülle.

Diese Prozesse wurden meist elektronenmikroskopisch untersucht, wobei einzelne Schritte kontrovers diskutiert werden.

In der Phase der Transportknospung überwinden die viralen Vorläufer die Kernhülle und gelangen in das Zytoplasma. In dem Prozeß der Reifungsknospung erhalten die Nukleokapside ihre Virushülle und werden dann aus der Wirtszelle ausgeschleust.

Einstimmigkeit herrscht über die erste Phase der Transportknospung, in der ein Knospungsprozeß zwischen Nukleokapsid und der inneren Kernlamina stattfindet. Das Resultat sind umhüllte Nukleokapside, die sich im perinukleären Raum befinden.

Unklar ist, über welchem Mechanismus die Kapside die Kernmembran überwinden. Denn diese ist, im Gegensatz zur Zytoplasmamembran, keine dynamische Struktur

und dadurch normalerweise nicht permeabel. Die Transportprozesse zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma sind also an die Kernporen gebunden.

Ultrastrukturelle Untersuchungen konnten bei HCMV- infizierten Zellen Veränderungen der Kernhülle zeigen (Radsak, 1991). Diese äußern sich in fokalen Verdichtungen, die nicht nur in enger Nachbarschaft zu den Nukleokapsiden auftreten, sondern auch unabhängig hiervon. Möglicherweise stellen diese Verdichtungen Läsionen in der Kernhülle dar, die den Austritt der viralen Vorläufer ermöglichen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Lamine A und C ihren Phosphorylierungszustand bei vorliegender HCMV- Infektion ändern. Hierbei kommt es zur Dephosphorylierung spezifischer Epitope dieser Lamine (Radsak, 1991), die die fokalen Veränderungen bedingen.

Die im perinukleären Raum lokalisierten umhüllten Nukleokapside gelangen im weiteren Verlauf der Transportknospung in das Zytoplasma. Es wird angenommen, daß die temporäre Hülle der Kapside (von der inneren Kernmembran stammend) mit der äußeren Kernmembran fusioniert und so nicht umhüllte Nukleokapside in das Zytoplasma entlassen werden.

Im Zytoplasma findet die Phase der Reifungsknospung statt. Zunächst entstehen hierbei doppeltumhüllte virale Partikel. Die äußere Hülle fusioniert dann mit der Zellmembran und es werden einfach umhüllte Viren freigesetzt. Die Herkunft der Membranen, die während der Reifungsknospung die Nukleokapside umhüllen ist noch nicht völlig geklärt. Zum einem gibt es Hinweise auf einen endosomalen Ursprung (Tooze et al., 1993), zum anderem scheinen auch TGN- Anteile beteiligt zu sein (Eggers, 1992)

Über die Tegumentation der Kapside ist nur sehr wenig bekannt. Die C-Kapside können bereits mit Tegumentkomponenten isoliert werden (Gibson, 1993). Dies spricht für die Tegumentation vor der Reifungsknospung. Ungeklärt ist, ob die Tegumentation im Kern stattfindet oder zumindest dort beginnt, oder ob dieser Vorgang ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Eine Tegumentation im Zellkern wäre möglich, da Tegumentproteine hier nachweisbar sind.

Da das Tegument eine verbindende Struktur zwischen Virushülle und Nukleokapsid bildet, ist eine zentrale Stellung der Tegumentation in der Transportknospung wahrscheinlich, doch für die Reifungsknospung wesentlich.

1.8 Tegumentproteine

Das Tegument ist eine aus verschiedenen Proteinen bestehende Komponente, lokalisiert zwischen Kapsid und Virushülle. Die meisten dieser Proteine sind phosphoryliert. Über die strukturelle Organisation und über die Funktion ist nur wenig bekannt. Zu den Tegumentproteinen gehören unter anderem das: pp150 (ppUL32), pp65 (ppUL83), pp71 (ppUL82) und das pp28 (ppUL99).

Das pp71 ist frühzeitig nach Infektion und auch in der späten Phase der viralen Morphogenese im Zellkern lokalisiert (Hensel, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß pp71 bereits in der frühen Phase des Infektionszyklus exprimiert wird (Hensel, 1996). Eine wichtige Funktion ist die Tranksaktivierung von Promotoren mit ATF und AP-1 Elementen (Liu, Stinski, 1992), weiterhin kann es die Aktivität des MIEP (major- immediated early promotor- enhancer) erhöhen.

pp150 ist ein basisches Phosphoprotein, welches etwa 20% der Virusmasse ausmacht (Gibson, 1983). Im Gegensatz zu pp71 und pp65 besitzt es keine nukleäre Lokalisationssequenz, doch kann es trotzdem in der späten Replikationsphase im Zellkern detektiert werden (Hensel, 1995). Vornehmlich ist es allerdings im Zytoplasma lokalisiert. Mögliche Funktionen des pp150 könnten eine stabilisierende Wirkung auf die Kapside oder eine wichtige Rolle in der Transportknospung sein (Meyer, 1997).

Das Tegumentprotein pp28 ist im Gegensatz zu den anderen Tegumentproteinen nur im Zytoplasma zu finden. Als Komponente des Tegumentes ist es an der äußeren Oberfläche der viralen Kapside lokalisiert. In den DBs kommt es nicht vor (Landini et al., 1987).

Das pp65 (ppUl83) wird auch als das untere Matrixprotein bezeichnet. Es wird in der β-bis γ-Genexpressionsphase transkribiert zu einer mRNA von 4,0 kb Länge. Es hat ein molekulares Gewicht von 65 kDa.

Es ist ein quantitativ bedeutender Bestandteil des Tegumentes. Sofort nach der Infektion wird es unabhängig von der viralen Genexpression in den Zellkern transportiert. Dieser Vorgang impliziert eine wichtige Rolle des pp65 in der Initiation der viralen Genexpression und -replikation.

Weiterhin konnte die Fähigkeit des pp65 gezeigt werden, Chromosomen zu binden. Dies ist eine mögliche Ursache für das Auftreten von chromosomalen Aberrationen (Dal Monte et al., 1996). Untersuchungen von Sanchez et al. zeigten eine direkte

Interaktion zwischen pp65 und den Laminen, sowie eine Akkumulation dieses Tegumentproteins an der Kernmembran (Sanchez et al., 1998). Diese Beobachtungen machen eine bedeutende Rolle des pp65 in der fokalen Modifikation der Kernhülle und damit in der Transportknospung wahrscheinlich.

Der schnelle Kerntransport nach Infektion wird durch zwei unterschiedliche nukleäre Lokalisationssequenzen gesteuert (Schmolke, 1995a).

Neu synthetisiertes pp65 in hoher Quantität ist nur in der späten Replikationsphase nachweisbar. (Geballe et al., 1986).

In DBs, NIEPs und infektiösen Viren ist pp65 biochemisch detektierbar, doch kann es elektronenmikroskopisch in Viren und NIEPs nicht gesehen werden (Schmolke,1995). Untersuchungen zeigten, daß es für die HCMV-Replikation in humanen Fibroblasten nicht essentiell ist (Schmolke, 1995b). Hier konnten keine signifikanten Unterschiede in der viralen Replikation und Maturation gezeigt werden. Veränderungen, die bei der Infektion mit dem Wild-Typ Virus 3 bis 4 Tage nach Infektion auftreten, werden bei der Infektion mit der pp65-Deletions-Mutante 6 Tage nach Infektion beobachtet (Schmolke, 1995b).

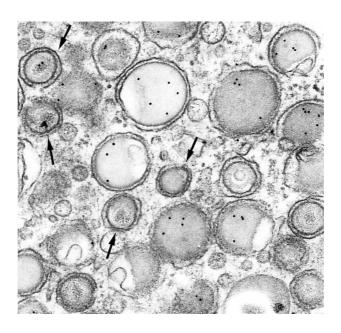


Abb.:1.6: Elektronenmikroskopische Lokalisation des Tegumentproteins pp65 in HCMV-infizieretn Zellen 96 Stunden p. i. mit Immunogold gekennzeinetem pp65 spezifischem polyklonalem Antiserum BgE1. Gezeigt werden pp65 positive DB's und die mit Pfeilen markierten pp65 negativen NIEP's. (Aufnahme freundlicherweise von Prof. Kern zur Verfügung gestellt)

1.9 Fragestellung

Das Gen, welches für das Phosphoprotein pp65 kodiert, wird bereits 4 Stunden nach Infektion unabhängig von der viralen DNA-Synthese transkribiert (Geballe et al., 1986; Depto et al., 1989). Zu diesem frühen Zeitpunkt sind nur sehr geringe Mengen des pp65 (weniger als 5% im Vergleich zur späten Phase) nachweisbar. 48 Stunden nach Infektion steigt die Transkriptionsaktivität dieses Gens auf ein hohes Niveau an. Das Genprodukt wird zunächst 24 Stunden nach Infektion im Zellkern lokalisiert (Plachter et al., 1990), bevor es im Zytoplasma detektiert werden kann.

Als quantitativ wichtigster Bestandteil der DBs (Irmiere und Gibson, 1983), ist es möglich, dass dieses Protein wichtige Signale für den Umhüllungsprozeß besitzt.

Verschiedene Untersuchungen implizieren auch eine wesentliche Bedeutung des pp65 für die Initiation der Genexpression und- replikation, denn pp65 wird sehr früh nach Infektion, unabhängig von der viralen Genexpression in den Zellkern transportiert (Schmolke, 1995a). Die direkte Interaktion zwischen pp65 und den Laminen, sowie dessen Akkumulation an der Kernmembran scheint Bedeutung in den fokalen Veränderungen der Kernmembran und damit in der Transportknospung zu haben (Sanchez et al., 1998).

Andere Untersuchungen aber zeigten, dass für die Virusreifung in Kultur pp65 nicht essentiell ist (Schmolke et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit sollten durch pulse- chase- Versuche neue Hinweise auf den nukleären Transport des Tegumentproteins pp65 (ppUL83) in der späten Phase der Virusreplikation gewonnen werden. Hierzu war es notwendig, zunächst das pulse- chase- System mit in vitro HCMV- infizierten primären Fibroblasten zu standardisieren. Nur bei Vorliegen, möglichst reiner Kern-Zytoplasmafraktionen, sind verifizierbare Aussagen über das Vorhandensein des pp65 im Zellkern oder Zytoplasma der Wirtszelle zu erwarten. Durch die pulse chase- Versuche ist auch eine Aussage über das quantitative Vorkommen des pp65 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion möglich, so dass dann Rückschlüsse auf den nukleären Transport getroffen werden können.

2 Material

2.1 Geräte:

7	
Zentrifugen	- Ultrazentrifuge Modell Sorvall Combi Plus (Dupont
	Company, Wilmington, Delaware/USA) mit dem Rotor
	SW 50.1
	- Kühlzentrifuge Modell J2-21 (Beckmann, München) mit
	dem Rotor JA 20 (Beckmann, München)
	- Tischkühlzentrifuge Modell RT 6000D mit dem Rotor H
	1000B (Dupont Company, Wilmington, Delaware/USA)
	- Tischzentrifuge für 1,5-2,0ml Reaktionsgefäße (Biofuge
	Heraeus, Sepatech)
	- Tischkühlzentrifuge (Biofuge fresco Heraeus, Osterode)
Schüttler	Drehschüttler (Eigenbau, Werkstatt Universität Marburg)
	- Vortex Genie 2 (Bender&Hobein AG, Zürich/Schweiz)
Elektrophorese-und	Minigelapparatur für PAGE (Keutz, Reiskirchen)
Blotting-Kammern	- Semidry-Blot-Apparatur für Western-Blotting Modell
	OEL (AGS, Heidelberg)
Optische Geräte	Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar)
	- Fluoreszenzmikroskop Diaplan mit Kamera (Leitz,
	Wetzlar)
	- konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM 410, Fa.
	Zeiss)
	– Elektronenmikroskop EM 109 (Carl Zeiss, Oberkochem)

	1
Zellkultur	- Tischzentrifuge Z 320, BHG Hermle (Hermle GmbH &
	Co, Gosheim)
	 CO₂-begaster Brutschrank IG 150 (Jouan, Frankreich)
	- Gewebekulturflaschen: Cellstar 250ml (75cm²) und 550ml
	(182cm²), (Greiner Labortechnik, Frickenhausen)
	- Gewebekulturschalen: Falcon 3004, 60x15mm (Becton
	Dickinson & Co, New Yersey, USA)
Sonstige	Imaging-Platte für BAS-MP (Fujifilm, Japan)
	- BAS-Cassette 2040 (Fujix, Japan)
	- pH-Meter Modell pH 522(WTW, Weilheim)
	 Waage Modell 1219 MP (Sartorius, Göttingen)
	– Dounce-Homogenisator (??)
	- H ₂ O-Reinstwasser-System Clear (SG)
	 Magnetrührer Modell MR 2000 (Fa. Heidolph)
	 Heizblock (Liebisch, Bielefeld)
	 Geltrockner Modell 583 (BioRad,USA)
	 Szintillationszähler PW 4700 (Phillips, Holland)
	- Centricon®-10 (Amicon, USA)
	 Ultraschallgerät: Labsonic 1510 (B. Braun, USA)
	 Ultramikrotom OM U2 (Reichert/Heidelberg)
	– Gelatinekapseln,V=360μl,(Pohl-
	Boskamp/Hohenlockstedt)

2.2 Chemikalien:

Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
APS	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl)	Merck, Darmstadt
Chlorwaserstoff	Merck, Darmstadt
Cystein	Merck, Darmstadt
DAB	Sigma, St. Louis/USA
di-Kaliumhydrogenphosphat H ₂ O-frei	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Dodecylbernsteinsäureanhydrid	Serva, Heidelberg
DTT	Roth, Karlsruhe
Eagle's MEM	Gibco/BRL, Eggenstein
EDTA	Sigma, St. Louis/USA
EGTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Riedel de Haen, Seelze
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS (fetales Kälberserum)	Seromed, Berlin
Folin Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycidether	Serva, Heidelberg
Glycin	CN, Ohio/USA
Glycerol	Serva, Heidelberg
H_2O_2	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Töpfer, Dickmannsried
Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Gibco/BRL, Eggenstein
Gibco/BRL, Eggenstein
Serva, Heidelberg
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
J.T. Baker, Deventer, Holland
Merck, Darmstadt
Schleicer & Schüll, Dassel
Calbiochem, CA
Merck, Darmstadt
Merck, Darmstadt
Seromed, Berlin
Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Serva, Heidelberg
Sigma, Deisenhofen

Rotiphorese Gel 30%	Roth, Karlsruhe
SDS	ICN, Biomedicals, Ohio/USA
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Streptomycin Sulfat	Seromed, Berlin
Sucrose	Roth, Karlsruhe
TCA	Fluka, Neu Ulm
TEMED	Serva, Heidelberg
2,4,6-Tris(Dimethylaminomethyl)phenol	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Seromed, Berlin
Tween 20	Merck-Schuchardt, München
Whatman 3MM-Papier und Filterplättchen	Whatman, New Jersey/USA

2.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen:

(Maniatis et al., 1989)

Alle verwendeten Lösungen wurden mit sterilem entionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (H₂O-Reinstwasser-System Clear(SG)) angesetzt.

1x PBS (Phosphat Buffered Saline):	- 8,0g NaCl
	- 0,2g KCl
	- 1,15g Na ₂ HPO ₄
	_ 0,2g KH ₂ PO ₄
	zu 11 mit H ₂ O auffüllen; pH 7,25

10x SDS-Laufpuffer:	- 30,3g Tris
	- 144,0g Glycin
	- 10,0g SDS
	zu 11 mit H ₂ O auffüllen
5% Blotto	 5g Magermilchpulver
	ad 100ml mit 1x PBS auffüllen
4x Laemmli (Probenpuffer für SDS-Page):	- 0,6g DTT
	- 2ml 1M Tris/HCl pH 6,8
	- 3ml 20% SDS
	- 4ml Glycerin
	- 1 Messerspitze Bromphenolblau
	- 1ml H ₂ O
	Aufbewahrung bei -20°C
Semidry-Blot-Puffer:	- 20% (v/v) MetOH
	- 4% (v/v) SDS
	- 0,581% (w/v) Tris
	- 0,293% (w/v) Glycin
1x Naß-Blot-Puffer:	- 3,03g Tris
	- 14,4g Glycin
	zu 11 mit H ₂ O auffüllen

RIPA-Puffer:	- 1g NP-40
	- 5ml 10% Na-Desoxycholat
	- 0,5ml 20% SDS
	- 7,5ml 2M NaCl
	- 5,0ml 1M Tris/HCl pH 8,0
	– 100μl Aprotinin
	- 1,0ml 100 mM PMSF
	zu 80ml mit H ₂ O auffüllen
DNAse Suspension:	– 400μg DNAse I
	- 0,5ml H ₂ O
	- 0,5ml Glycerol
	- 0,1mM DTT

2.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur:

Die Herstellung der Lösungen erfolgte unter Einhaltung steriler Kautelen.

Kulturmedium für humane Fibroblasten:	- 9,5g Eagle's MEM
	- 2,2g NaHCO ₃
	– 10ml MEM Vitamin-Lösung
	(100x)
	- 10ml MEM nicht essentielle
	Aminosäuren (100x)
	- 100000 IE Penicillin G
	- 10 mg Streptomycin-Sulfat
	- 10% FCS
	zu 11 mit H ₂ O auffüllen
	pH 7,3 bis 7,4

- 9,5g Eagle's MEM			
- 2,2g NaHCO ₃			
– 10ml MEM Vitamin-Lösung			
(100x)			
– 10ml MEM nicht essentielle			
Aminosäuren (100x)			
- 1% Penicillin/Streptomycin			
- 2% FCS			
zu 11 mit H ₂ O auffüllen			
pH 7,3 bis 7,4			
- 0,6g Penicillin G			
- 1,0g Streptomycin			
in 100ml 1x PBS			
- 0,951g EGTA			
- 1,25g Trypsin			
in 500ml 1x PBS, pH 7,4			

Die Penicillin/Streptomycin Stammlösung und die Trypsin/EGTA- Lösung wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

2.5 Enzyme, Antibiotika, Marker, Standards und Isotope:

Proteinmarker	- Prestained	SDS-PAGE	Standards	high,	(BioRad,
	München))			
	- Prestained	SDS-Page	Standards	low,	(BioRad,
	München)				

Enzyme	DNAse I, Serva (Boehringer Ingelheim, Heidelberg)
Rinderserumalbumin	1 mg BSA/1ml 0,1 N NaOH
Temacisci amaioammi	I mg Bory mii v,i iv ivacii
Antibiotika	- Penicillin G (Seromed, Berlin)
	Streptomycin Sulfat (Seromed, Berlin)
	25
Isotop	Tran ³⁵ S-Label, ICN Pharmaceuticals, Inc., Kalifornien

2.6 Verwendete Antikörper

- Ziege-α-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt (BioRad, München)
- Ziege-α-Maus-IgG, HRP-gekoppelt (BioRad, München)
- Kaninchen-α- Ziege-IgG, HRP-gekoppelt (Dako, Denmark)
- α-Lactat Dehydrogenase von der Ziege (Rockland, PA/USA)
- α-Lamin B von der Maus (Dianova, Hamburg)
- α-TRAM (translocating chain-associating membrane protein) vom Kaninchen (Görlich et al.,1992; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Schröder, Labor von Dr. Dobberstein, ZMBH Heidelberg)
- BGE1, α-pp65-Fusionsprotein (Gluthation-S-Transferase-pp65 As 325-511) vom Kaninchen (Hensel et al.,1995)
- α-pp65 Hybridome (65-8, 65-14, 65-33) von der Maus (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Plachter, Institut für Virologie, Mainz)
- α-CMV, early nuclear protein von der Maus (Dupont, Wilmington/USA))

3 Methoden

3.1 Gelelektrophoretische Analyse der Proteine

3.1.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Hierbei wandern elektrisch negativ geladene Moleküle in einer Gelmatrix unter dem Einfluß eines äußeren elektrischen Feldes. Diese Gelmatrix besteht aus Acrylamidpolymeren, die über N'N'-Methylenbisacrylamid quervernetzt werden. Die Acrylamidpolymerisation ist eine Reaktion, die durch den Zerfall von Peroxidsulfationen (APS) in Radikale ausgelöst wird. Jene aktivieren Tetramethylethyldiamin-Moleküle (TEMED).

Für die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe ist die Zugabe des ionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wesentlich. Hierdurch werden die Proteine denaturiert, SDS geht nichtkovalente Wechselwirkungen mit lipophilen Regionen der Proteine ein und lädt sie negativ. Die durch SDS aufgebrachte Ladung ist so groß, daß die Eigenladung der Proteine keine Rolle mehr spielt. Durch die weitere Zugabe von reduzierenden Substanzen, wie β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) kommt es durch Auflösung von Disulfidbrücken zur vollständigen Proteinentfaltung. Alle Proteine sind negativ geladen und wandern im elektrischen Feld ausschließlich gemäß ihrer molekularen Größe unterschiedlich schnell zur Anode. Bei der Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) ist dem Trenngel ein Sammelgel vorangestellt, dessen pH-Wert um zwei Einheiten niedriger ist als der im Trenngel. Hierdurch erfolgt eine Ankonzentrierung der denaturierten Proteine vor dem Trenngel, was eine bessere Auftrennung zur Folge hat. Durch das Mitführen eines Standardmarkers lassen sich die Proteine entsprechend ihres molekularen Gewichtes durch Vergleich mit dem Marker identifizieren.

Lösungen:

- 1) 30% (w/v) Polyacrylamidlösung (PAA)
- 2) 10% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat (APS) in aq. dest.
- 3) 20% (w/v) Natriumdodecylsulfat in aq. dest.
- 4) Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- 5) 2M Tris-HCl, pH 8,8 (Trenngelpuffer)
- 6) 1M Tris-HCl, pH 6,8 (Sammelgelpuffer)
- 7) 1x SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl

190 mM Glycin

0.1% (w/v) SDS

8) 1x Laemmli-Probenpuffer der Fa. BioRad

Durchführung:

Die SDS-PAGE erfolgte in Minigel-Apparaturen der Fa. Keutz. Hierfür wurden Gele mit einer Polyacrylamidkonzentation von 12,5% oder 10% im Trenngel und von ausschließlich 5% im Sammelgel verwendet (siehe Tab.: 2.1). Das Gel wurde zwischen 2 fettfreien Glasplatten (10cm x 7,5cm bzw. 10cm x 8,2cm) gegossen, die durch Abstandshalter von je 1,0 bzw. 1,5mm Dicke auseinandergehalten wurden und in einem Gießstand eingespannt waren. Nachdem das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen war, wurde es mit aq. dest. überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation des Trenngels wurde das aq. dest. abgegossen. Das Trenngel wurde dann mit der Sammelgellösung überschichtet und Probentaschenkamm eingesetzt. Dieser konnte nach abgeschlossener Polymerisation entfernt werden. Das Gel wurde in die Gelkammer eingesetzt und in die Minigel-Apparatur der Fa. Keutz überführt. Sowohl die innere abgeschlossene Kammer, als auch die äußere wurden mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Hiernach erfolgte die Beladung der Geltaschen mit den Proteinproben. Diese wurden zuvor der Wessel-Fällung (siehe 3.1.2), unterzogen, um eine Proteinankonzentrierung zu erreichen. Die dabei erhaltenen Pellets wurden in reduzierendem 1x Laemmli-Puffer aufgenommen und für 3 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 90 Minuten bei Raumtemperatur. Um eine optimale Lauffront zu erreichen, wurde eine initiale Spannung von 80 V für 15 min. angelegt. Nachdem die Lauffront der

Proteine das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 130V erhöht. Als Molekulargewichtsstandard dienten vorgefärbte Proteingemische der Fa. Bio Rad (München).

Marker	Molekulargewichte MW in Da
low range prestained:	111000
	77000
	48200
	33800
	28600
	20500
high range prestained:	201000
	120000
	85000
	47000

Tabelle 2.1

Nach der Gelelektrophorese konnten die Proteine entweder im Gel angefärbt (siehe 3.1.3) oder auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (siehe 3.1.4) werden.

Die Zusammensetzung der Gele:

	Trenngel	12,5%	Trenngel	10%	Sammelgel 5%
	1mm	1,5mm	1 mm	1,5 mm	
30% PAA	2,81 ml	3,75 ml	2,4 ml		0,83 ml
1M Tris/HCl, pH 6,8	%	%	%	%	0,625 ml
1M Tris/HCl, pH 8,8	1,26 ml	1,68 ml	1,34 ml		%
20% SDS	33,8 μl	45 μl	36 μΙ		25μ1
H2O	2,64 ml	3,52 ml	3,42 ml		3,425 ml
TEMED	3,8 μl	5 μΙ	3,8 μl		10 μl
10% APS	18,8 μl	25 μl	20 μ1		80 μ1

Tabelle 2.2

3.1.2 Proteinfällung nach Wessel

Diese Methode wurde genutzt, um eine Ankonzentrierung der Proteine zu erreichen.

Lösungen:

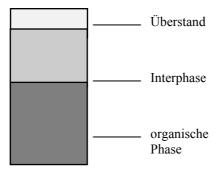
- 1) Methanol
- 2) Chloroform
- 3) aq. dest.

Durchführung:

Zur Probe wurde zunächst das 4 fache Volumen an Methanol, dann das 1 fache Volumen an Chloroform und schließlich das 3 fache Volumen an aq. dest. zugegeben. Dieses Gemisch wurde gut gevortext. Es folgte eine 3 minütige Zentrifugation bei 13000rpm bei RT, der resultierende Überstand wurde verworfen. Die resultierende organische Phase und Interphase wurden mit dem 3 fachen Probevolumen Methanol versetzt. Danach wurde nochmals gut gemischt und für

weitere 3 Minuten bei 13000rpm die Proteine pelletiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und dann in 1x reduzierenden Laemmli-Puffer aufgenommen.

Skizze:



Benötigte Volumina am Beispiel einer 100 µl Probe (in entsprechender Reihenfolge):

Proteinlösung	Methanol	Chloroform	aq. dest.	Methanol
100 μ1	400 μ1	100 μ1	300 μ1	300 μ1

Tabelle 2.3

3.1.3 Silberfärbung nach Hempelmann

(Hempelmann et al., 1986)

Die Proteine werden bei der Silberfärbung direkt im Gel angefärbt, die Empfindlichkeit dieser Methode liegt unter 1ng Protein pro Bande.

Bei Färbung der Gele mit Coomassie Brilliant Blau R250 liegt die Nachweisgrenze mit 0,1 bis 0,2µg sehr viel höher, daher wurde diese Methode nicht angewandt.

Als Färbelösung diente Silbernitrat. Einige Silberionen binden an die Proteine, wo die Reduktion zu metallischem Silber schneller stattfindet, als im restlichem Gel. Die Proteinbanden färben sich dunkelbraun bis schwarz. Um die Reaktion aller Silberionen im Gel zu vermeiden muß die Reduktion rechtzeitig gestoppt werden.

Lösungen:

1) Fixierlösung 10% Essigsäure

2) Reduktionslösung 20% (v/v) EtOH

5% (v/v) Essigsäure

75% (v/v) aq. dest.

0,002% (w/v) DTT (Dithiothritol)

3) Oxidationslösung 0,5% (w/v) Kaliumdichromat

4) Färbelösung 0.1% (w/v) AgNO₃

5) Entwicklerlösung 3% (w/v) Na₂CO₃

0,02% (w/v) Paraformaldehyd

6) Stopplösung 2% (v/v) Essigsäure

7) Imprägnierlösung 50% (v/v) MetOH

10% (w/v) Glycin

40% (v/v) aq. dest.

Durchführung:

Die Gele wurden 30 min. in Lösung 1) fixiert, anschließend in Lösung 2) für 30 min. inkubiert und in Lösung 3) für 5 min. oxidiert. Es folgte eine Wässerung der Gele bis nur noch eine leichte Gelbfärbung erkennbar war. Hieran schloß sich die Färbung mit Lösung 4) für 10 min. an. Dann wurde der Entwickler 5) zum Gel gegeben. Nach kurzem Schwenken (bis der Entwickler trüb war) wurde dieser gewechselt und bis zur endgültigen Färbung belassen. War diese erreicht, wurde mit Lösung 6) die Reaktion abgestoppt, das Gel fotografiert und vor der Trocknung 60 Minuten in Lösung 7) inkubiert.

3.1.4 Western- Blot- Analyse von Proteinen

Das Western-Blotting dient dem Transfer der Proteine von einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Dies ist möglich unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes, denn alle Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel tragen eine negative Ladung und wandern somit zur Anode. Da die Nitrocellulose auf die Seite des Geles plaziert wird, welche der Anode zugewandt ist, werden die Proteine nach

Durchlaufen des Geles an der Nitrocellulosemembran gebunden. Hierbei ändert sich deren geometrische Position nicht, da das elektrische Feld senkrecht zum Gel angelegt wird. Die dann an der Membran vorliegenden immobilen Proteine sind immunologischen Nachweismethoden zugänglich und können z. Bsp. durch die Verwendung spezifischer Antikörper dargestellt werden.

Bei dem elektrophoretischen Transfer der Proteine werden zwei Blotsysteme unterschieden, daß Naß-und das Semidry-Blotting.

3.1.4.1 Semidry- Blot- Verfahren:

Lösungen:

Semidry-Blot-Puffer: 20% (v/v) MetOH

4% (v/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)

0,581% (w/v) Tris

0,293% (w/v) Glycin

Durchführung:

Nach erfolgter Auftrennung der Proteinproben in der SDS-PAGE, wie oben beschrieben, erfolgte der Proteintransfer in einer Semidry-Blot-Apparatur für Western-Blotting (AGS, Heidelberg). Hierfür wurden sechs Filterpapiere (Whatman, 3MM, Schleicher und Schüll, Dassel) und die Nitrocellulose (Schleicher und Schüll, Dassel) in Gelgröße zugeschnitten. Die Nitrocellulosemembran wurde zunächst in aq. dest. eingelegt und hiernach, wie die Filterpapiere in Semidry-Blot-Puffer getränkt. Drei der so naßgetränkten Whatman-Papiere wurden als erstes auf die kathodische Seite der Apparatur plaziert. Hierauf folgte das Gel und dann die Nitrocellulose. Zur Anode wurde der Aufbau durch wiederum drei naßgetränkte Whatman-Papiere abgeschlossen. Es wurde stets darauf geachtet, daß sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befanden. Der Deckel der Apparatur wurde aufgelegt und festgeschraubt. Für den Transfer floß ein Strom von 2 mA/cm² Blotoberfläche für 60 Minuten.

3.1.4.2 Naß-Blot-Verfahren:

Lösungen:

1x Naβ-Blot-Puffer: 3,03g Tris

14,4g Glycin

zu 11 mit H₂O auffüllen

Durchführung:

Zur Durchführung des elekterophoretischen Transfers der Proteine wurde eine Standardapparatur nach Bittner et al. benutzt. Die Anordnung der Whatman-Papiere, der Nitrocellulose und des Gels erfolgte analog zur Semi-dry-Blot Methode. Das Blotsandwich, zu beiden Seiten von einem Kunststoffvlies flankiert, wurde zwischen zwei gelochten Plastikplatten eingespannt. Die Vliese, Whatman-Papiere und Nitrocellulose-Membran wurden in dem 1x Blotting-Puffer getränkt. Nach Entfernung eventuell vorhandener Luftblasen wurde der gepackte Gitterkasten vertikal in den Puffertank eingebracht. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Nitrocellulosemembran zur Anode gerichtet ist. Der Tank wurde mit Puffer aufgefüllt und das elektrische Feld mit einer Spannung von 40V für 120 Minuten angelegt.

Der Transfer der Proteine wurde durch eine Ponceaufärbung überprüft:

Lösungen:

- 1) 1x PBS
- 2) Ponceaulösung
- 3) 7% Essigsäure

Durchführung:

Nach 5 minütigem Waschen der Nitrocellulose in 1x PBS wurde die Ponceaulösung für weitere 5 Minuten auf die Membran gegeben. Der ebenfalls gefärbte Hintergrund

der Nitrocellulosemembran konnte mit 7% Essigsäure entfärbt werden. Diese wurde bis zur endgültigen Entfärbung des Hintergrundes belassen. Dabei wurden die Proteinbanden deutlich sichtbar. Vor Durchführung der Immunreaktion wurden die Proteinbanden durch eine entsprechend lange Inkubation in 1x PBS entfärbt.

3.1.4.3 Immunreaktion:

Die in der Nitrocellulose vorliegenden immobilen Proteine werden durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht. Dies ist möglich, da der eingesetzte Zweitantikörper mit einem Indikator gekoppelt ist. Dieser Zweitantikörper bindet an den Erstantikörper, welcher spezifisch für das zu detektierende Protein ist und mit diesem ein Antigen-Antikörper-Komplex eingeht. Durch verschiedene Waschschritte werden nicht an der Membran fixierte Antikörper entfernt. In der nachfolgenden Umsetzung des Indikators wird so das Protein qualitativ nachgewiesen. Unspezifische Bindungsstellen werden vor Einleitung der Immunreaktion durch Inkubation des Blottes in fettfreiem Magermilchpulver (Blotto) blockiert.

Lösungen:

1) Blockierungspuffer (PBS-B) – 4% (v/v) Blotto in PBS

2) Erstantikörper – 1:25-1:200

3) Zweitantikörper – Ziege anti Kaninchen IgG, Peroxidase

gekoppelt 1:1000

- Ziege anti Maus IgG, Peroxidase

gekoppelt 1:1000

- Kaninchen anti Ziege 1:2000

jeweils in PBS-B

4) Waschlösung -0.05% (v/v) Tween 20 in PBS

5) Entwicklerlösung

- 0,03% (w/v) 4-Chloro-1-Naphtol
- 20% (v/v) eiskaltes MetOHin 1x PBS

 - 0,03% (v/v) H₂O₂ (Zugabe zur Entwicklerlösung unmittelbar vor dem Färben)

Durchführung:

Nach kompletter Entfernung des Ponceau, wurde die Nitrocellulose zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1h in Lösung 1) bei RT auf dem Schüttler oder alternativ über Nacht bei +4°C inkubiert. Anschließend wurde der Blot für 2h bei RT mit dem jeweiligem Erstantikörper 2) inkubiert. Zur Entfernung nichtgebundener Antikörper wurde der Blot 5x3 min. mit Lösung 4) gewaschen. Der Zweitantikörper 3), welcher als Indikator Meerrettich-Peroxidase trug, wurde für eine weitere Stunde bei RT zum Blot gegeben. Nach Beendigung der Zweitantikörperreaktion wurde der Blot erneut für 4x3 min. in Lösung 4) und 2x3 min. in 1x PBS gewaschen. Nach diesen Waschschritten sollten nur noch über das Antigen an der Membran fixierte Antikörper vorhanden sein. Nun erfolgte die Umsetzung des Indikators. Hierzu wurde das H₂O₂ erst unmittelbar vor Gebrauch der Lösung 5) hinzugegeben. Die Färbung wurde in aq. dest. abgestoppt und dann fotografiert. Alle Waschschritte wurden bei RT durchgeführt.

3.1.4.4 Einsatz der Antikörper:

Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
LDH	1:500	Anti-Ziege	1:2000
Lamin B	1:40	Anti-Maus	1:1000
pp65-Hybridome	1:100	Anti-Maus	1:1000
BGE1	1:100	Anti- Kaninchen	1:1000
TRAM	1:200	Anti-Kaninchen	1:1000

Tabelle 2.4

3.1.5 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Methode nach Lowry et al. (1951) und der Bicinchoninsäure-Assay verwendet.

Die Methode nach Lowry weist eine gute Sensibilität und Detergentientoleranz auf. Zur Proteinprobe wird zunächst das Lowry-Reagenz gegeben. Es kommt zur Bildung von Kupfer-Protein-Komplexen. Diese reduzieren die Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz und es entsteht ein blauer Farbkomplex. Dessen Intensität wurde photometrisch bei λ =750 nm bestimmt und die Proteinkonzentration der Probe anhand eines mitgeführten Standards ermittelt.

Der Bicinchoninsäure-Assay hat eine höhere Sensibilität und ist weniger störanfällig. Die Proteine reduzieren hierbei das Kupfer(II)sulfat zu Kupfer(I)sulfat, zu welchem die Bicinchonin Säure eine hohe spezifische Affinität besitzt. So entstehen die rötlichen Farbkomplexe mit einem Absorptionsmaximum bei λ =562 nm. Auch hier wurde die Proteinkonzentration der Proben anhand eines mitgeführten Standards ermittelt.

Als Eichprotein diente bei beiden Methoden Rinderserumalbumin (1mg BSA/1ml 0,1N NaOH).

Da in den ursprünglichen Proben hohe Salzkonzentrationen enthalten waren, wurde zunächst eine TCA-Fällung durchgeführt.

3.1.5.1 Lösungen für die TCA-Fällung:

- 1) 100% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)
- 2) aq. dest.
- 3) 0,1N NaOH
- 4) Probenvolumen x

Zu den Proben 4) wurde soviel Volumen an Trichloressigsäure 1) gegeben, daß die TCA-Endkonzentration 10-13% betrug. (Beispiel: Erwünschtes Endvolumen=150µl: Probenvolumen 15µl+120µl aq. dest.+15µl TCA). Nach der TCA Zugabe wurde für 1h im Eisbad inkubiert, hieran schloss sich eine 10 minütige Zentrifugation bei 13000rpm und +4°C an. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets mit 10% TCA gewaschen und es wurde nochmals zentrifugiert. Mittels Kapillarspitzen wurden alle Säurereste aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Das Trocknen der Pellets erfolgte im Schüttler bei 37°C. Nachdem sie sehr gut getrocknet waren, wurden sie in 50µl 0,1N NaOH aufgenommen. Bei Nichtlösen des Pellets erfolgte eine pH-Wert Überprüfung. Hierfür wurde ein definiertes Volumen entnommen und per Indikatorpapier der pH-Wert bestimmt. Konnte ein saurer pH-Wert festgestellt werden, so wurde über die Zugabe von 5-bis15µl höher konzentrierter NaOH (1-oder 5 N NaOH) ein basischer pH-Wert eingestellt, bis das Pellet in Lösung ging. Die so von Salzen gereinigten Proben wurden zur Proteinbestimmung eingesetzt, unter Beachtung der neuen Volumina.

3.1.5.2 Lösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry:

(Lowry et al., 1951)

1) 1N NaOH

2) Lowry - Reagenz – 0,5 ml 1% (w/v) CuSO₄-Lösung

- 0,5 ml 2% (w/v) Na-K-Tatrat

- 49 ml 2% (w/v) Na₂CO₃ in 0,1 N

NaOH

3) Folin - Reagenz Folin-Lösung 1:2 mit aq. dest. verdünnt

4) Proteinstandard 1mg/ml BSA in 0,1 N NaOH

Durchführung:

Zunächst wurde eine Proteinstandardreihe vorbereitet. Hierfür wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße 0 bis 100µg (0, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100µg) des Proteinstandards 4) gegeben. Von den Proben wurden je 25µl eingesetzt. Die zu bestimmenden Proben und die Proteinstandards wurden mit 0,1 N NaOH auf 100 µl aufgefüllt. Zu jedem Ansatz wurden 1000 µl frisch angesetztes Lowry-Reagenz 2) gegeben. Es schloß sich eine 10 minütige Inkubation bei RT an. Dann wurde das Folin-Reagenz 3) zugefügt und eine Inkubation von 30 Minuten ebenbfalls bei RT vorgenommen. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 750nm gemessen. Alle Pipettierschritte erfolgten im gleichmäßigem Zeittakt und stets wurde gut gemischt.

3.1.5.3 Lösungen des Bicinchoninsäure- Assays:

- 1) 1N NaOH
- 2) Bicinchonin Säure
- 3) Kupfer(II)Sulfat Pentahydrat 4% Lösung
- 4) Reaktionslösung 1% (v/v) Lösung 2)
 - 49% (v/v) Lösung 1)

Durchführung:

Analog zum Lowry- Assay wurde die Proteinstandardreihe erstellt. Die Proben und Proteinstandards wurden auch hier mit 0,1N NaOH zu $100~\mu l$ aufgefüllt. Alle Ansätze wurden dann mit je $1000~\mu l$ der zuvor angesetzten Reaktionslösung 4) versetzt. Nach gutem Mischen wurde für 30~min. bei $37^{\circ}C$ im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen der Reaktionsgefäße auf Raumtemperatur erfolgte die Extinktionsmessung bei $\lambda=562~nm$.

Berechnung der Proteinkonzentration:

Beispiel:

- 1) eingesetztes Volumen aus einer Fraktion z. Bsp. Homogenat: 15µl
- 2) erhaltenes Volumen nach der TCA-Fällung: 65µl
- 3) davon zur Proteinbestimmung entnommenes Volumen: 25µl

Bei einer errechneten Proteinkonzentration von 0,22µg/µl des eingesetzten Probevolumens mit 25µl 3) errechnet sich für die Fraktion Homogenat 1) unter Berücksichtigung des Volumens nach der TCA-Fällung 2) eine Konzentration von 0,95µg Protein/µl Homogenat

3.2 Zellkultur

Für die Experimente wurden primäre humane Vorhaut-Fibroblasten (HFF) von der Passage 14 bis 25 verwendet. Sie wurden bei 37°C im 5% CO₂ begasten Brutschrank gehalten. Die humanen Fibroblasten waren aus Säuglingspräputien isoliert worden und wurden freundlicherweise von Prof. K. Radsak zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Medien und Lösungen:

- 1) Fibroblasten-Kulturmedium (MEM, 10% FCS)
- 2) Fibroblasten-Infektionsmedium (MEM, 2% FCS)
- 3) PenicillinG (100000 IE/l) /Streptomycin-Sulfat-Lösung (10mg/l)
- 4) Trypsin (0,25% w/v) /EGTA (5mM)-Lösung
- 5) Auftaumedium (MEM, 20% FCS)
- 6) Einfriermedium (50% FCS, 7,5% DMSO, 42,5% MEM)

3.2.2 Kultivierung:

Zur Züchtung und für die Experimente wurden die Zellen bei 37°C im 5% CO₂ begasten Brutschrank gehalten. Bei Vorliegen eines konfluenten Zellmonolayers erfolgte die Passagierung der Fibroblasten. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend inkubierten die Zellen für 5-bis 10min. in Trypsin/EGTA-Lösung 4) im Brutschrank, um eine Ablösung der Zellen vom Kulturflaschenboden zu erreichen. Die abgelösten Zellen wurden in 10% MEM 1) aufgenommen und für 5min. bei 900 rpm pelletiert. Das erhaltene Zellpellet konnte nun im entsprechenden Kulturmedium suspendiert werden und wurde auf die gewünschte Anzahl neuer Kulturflaschen ausgesät. Orientierend sollten das Aussäen so erfolgen, daß mind. 6000 Zellen/cm² Kulturboden vorliegen. Alle verwandten Lösungen waren 37°C warm.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden HFF-Zellen in Einfriermedium aufgenommen und in Einfrierröhrchen (Fa. Costar, Cambridge, USA) in flüssigem Stickstoff gelagert. Vor Einbringen in den flüssigen Stickstoff erfolgte die langsame Abkühlung der Zellen, indem diese zunächst 1 Stunde auf Eis und 24 Stunden bei - 70°C gelagert wurden.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen in das 37°C warme Wasserbad gestellt. Sobald das Medium aufgetaut war, wurden die Zellen sofort im Auftaumedium in einem Verhältnis von 1:15 aufgenommen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 200g wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 20% FCS/MEM suspendiert, in 250ml Gewebekulturflaschen ausgesät und hierin für zunächst 24 Stunden gehalten. Dieses Medium wurde nach 24 Stunden abgenommen und der Zellmonolayer mit 10% FCS/MEM überschichtet.

Das weitere Kultivieren der HFF-Zellen erfolgte dann in 10% FCS/MEM.

3.3 Virus und Infektion

3.3.1 Virus-Stamm

Die Infektionen der HFF-Zellen wurden mit dem Laborstamm AD169 (Gupta et al., 1977) des humanen Zytomegalievirus im Infektiomsmedium durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung des Virus- Titers

Lösungen:

- 1) HFF-Zellen
- 2) Infektionsmedium
- 3) Virusstock, mit der zubestimmenden Infektiosität
- 4) 75% Methanol
- 5) 1xPBS
- 6) PBS-1%BSA
- 7) Primärantikörper: α-Immetiated early (IE)-Antigen (Dupont, wilmington, USA)
- 8) Sekundärantikörper: α-Maus-IgG-HRP (Biorad)
- 9) Entwicklerlösung: 0,5 mg/ml 3,3'-Diamino-benzidin-hydrochlorid (DAB, Fa. Fluka, Neu-Ulm) und 0,03% (v/v) H₂O₂ in PBS (erst unmittelbar vor Gebrauch der Entwicklerlösung zugeben)

Die Virus- Titer wurden durch Infektion von HFF-Kulturen in einer Endpunktverdünnung gemessen. Hierbei wurde die TCID₅₀ (tissue culture infective dose 50) bestimmt. Diese gibt die Verdünnung an, bei der 50% der behandelten Kulturen infiziert werden. Hierzu wurden HFF-Zellen in 96-well-Platten (Microtest IIITM Gewebekulturplatten von Falcon) ausgesät (2x10⁴ Zellen/Vertiefung in einem Volumen von 100μl Infektionsmedium vorliegend). Am folgenden Tag wurde eine zehnfache Verdünnungsreihe des zu testenden Virusstocks angelegt und je vier HFF-Kulturen mit 100μl jeder Verdünnung infiziert. Mitgeführt wurden als Kontrollen Virusstock-infizierte und nicht-infizierte Kulturen.

Zum Nachweis der Infektion einer Kultur diente die Antikörperreaktion gegen HCMV- IE- Antigen in den Kernen infizierter HFF-Zellen. Dazu wurde 24 Stunden p.i. das Infektionsmedium abgenommen und die Kulturen mit eiskaltem 75%-igem Methanol überschichtet. Um die Zellen auf der Kulturplatte zu fixieren, wurde für 10 min. bei -20°C inkubiert. Zur Rehydratation und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Kulturen 2x mit PBS und 1x mit 100µl PBS-1%BSA überschichtet, nach kurzer Inkubationszeit wurden diese Lösungen durch vorsichtiges Absaugen entfernt. Nun erfolgte die Erstantikörperreaktion für 1 Stunde bei RT mit je 50μl α- IE- Antikörper pro Kultur. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS-1%BSA eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 2 Minuten bei RT wurde der Zweitantikörper zu den Kulturen gegeben. Als Zweitantikörper diente α-Maus IgG- Peroxidase gekoppelter Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS-1%BSA. Die Reaktion fand bei RT für 30 min. statt, sie wurde durch fünfmaliges Waschen mit PBS abgestoppt. Es folgte nun der Farbnachweis durch Hinzugabe der Entwicklerlösung für 30 min (erst unmittelbar vor Zugabe der Entwicklerlösung wurde H₂O₂ zugegeben).

Lichtmikroskopisch wurden die infizierten Zellen ausgezählt, zum Vergleich diente die mitgeführte Positivkontrolle, in der sich die infizierten Zellen durch eine Braunfärbung ihrer Zellkerne auswiesen.

Ein gefärbter Zellkern pro Kultur reichte für deren Einstufung als infiziert aus.

Da nicht immer zufällig ein Verdünnungs-Endpunkt erreicht wurde, bei dem genau 50% der Kulturen infiziert wurden, wurde dieser rechnerisch nach Spearman und Kärber (Spearman, 1908; Kaerber, 1931) folgendermaßen ermittelt:

-log des 50%-Endpunktes = -log der höchsten verwendeten Viruskonzentration - ((Summe der % der inf. Kulturen jeder Verdünnung/100) x log der Verdünnung).

Da die Infektion bei der Messung mit 100µl Verdünnung erfolgte, mußte für die Umrechnung auf ml noch der Wert 1 vom Ergebnis subtrahiert werden. Wurde z. Bsp. ein Wert von 10^{-4,75} ermittelt, bedeudet dies, daß 1ml des Virusstocks in einer Verdünnung von10^{-4,75} eine Kultur mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% infiziert. Der Titer dieses Virusstocks wurde dann mit einer TCID₅₀ von 10^{4,75} angegeben.

3.3.3 Gewinnung eines infektiösen Virusstocks

Zunächst wurden HFF-Zellen bis zum Erreichen einer 80%-igen Konfluenz herangezogen. Die Infektion wurde mit einer TCID₅₀ von 0,01 vorgenommen, die zu infizierende Zellzahl der HFF-Zellen wurde durch Auszählen mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Zur Berechnung des einzusetzenden Virusvolumens sind folgende Werte notwendig:

- A) Anzahl der zu infizierenden HFF-Zellen (bestimmt mittels Auszählen in der Fuchs-Rosenthal-Kammer)
- B) gewünschte TCID₅₀ zur Infektion der HFF-Zellen (0,01)
- C) Infektiosität (TCID₅₀) des einzusetzenden Virus, mit dem infiziert werden soll

Die Menge an Virus wurde folgendermaßen berechnet:

Bsp.: A)7,5x10⁶; B)0,0125; C)10^{4,75}=5,6x10⁴ Entsprechend der aufgezeigten Formel folgt:1,6ml des Virusstocks sind einzusetzen.

Das ermittelte Volumen an Virus wurde mit 2% FCS/MEM auf ein Gesamtvolumen von 6ml ergänzt. Die Inkubation mit dem Virus erfolgte für 1,5 Stunden bei RT. Die Kulturflaschen befanden sich während dieser Zeit auf einer Wippe. Hierdurch und durch das zugeführte Volumen von 6ml war gewährleistet, daß der gesamte Zellmonolayer mit Virus benetzt werden konnte. Nach abgeschlossener Inkubation wurde das infektiöse Medium aus der Kulturflasche entfernt. Es wurde für die Inkubation von 9 Tagen ein ausreichendes Volumen an 2% FCS/MEM zugeführt.

Während dieser 9 Tage vollzog sich der Replikationszyklus des Virus dreimal. Regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen wurden durchgeführt, um bei einer eventuell zu stark vorgenommenen Infektion mit frühzeitiger Zerstörung der Zellen die vorzeitige Ernte des Virusstockes vorzunehmen.

Für die Ernte des Virusstockes wurde der Überstand aus den Kulturflaschen abgenommen, und in einer sterilen Flasche gepoolt. Dieses Material wurde auf Falcon- Reaktionsgefäße verteilt und bei 900rpm zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand beinhaltete das Virus und wurde bei -80°C gelagert.

3.3.4 Experimentelle HCMV- Infektion von HFF-Zellen

Lösungen:

- 1) HFF-Zellen
- 2) Infektionsmedium (MEM, 2%FCS)
- 3) Virusstock

Durchführung:

HFF-Zellen wurden bis zum Erreichen einer 70-80% Konfluenz im CO₂ begasten Brutschrank bei 37°C gehalten. Die Zellen einer Kulturflasche wurde nach dem Vorgehen des Abtrypsinierens mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Orientierend an der hierbei ermittelten Zellzahl erfolgte die Infektion der HFF-Kulturen.

Für alle Versuche wurde ein Virusstock mit einem Titer von $10^{4,75}$ TCID₅₀/ml verwendet. Die Infektionen wurden stets mit einer TCID₅₀ von 0,0125 durchgeführt. Bei Infektion von 10^6 Zellen mit 1ml des Virusstock mit einer TCID₅₀ von $10^{4,75}$ bedeutet dies, daß die TCID₅₀/Zelle = $10^{4,75}/10^6 = 0,056$ beträgt.

Bei einer ermittelten Zellzahl von 7,5x10⁶ sind nach oben angegebener Berechnung für die Infektion 1,6ml des Virusstocks einzusetzen (siehe 3.3.3).

Das Virusstockvolumen wurde mit Infektionsmedium verdünnt, so daß während der Inkubation der Gewebekulturflaschen der Zellrasen stets vollständig benetzt war. Nach einer Inkubation von 90min. bei RT auf einem Wiegeinkubator wurde das

Inokulum abgenommen und die Zellen in Infektionsmedium im CO₂ begastem Brutschrank bei 37°C bis zum experimentell bestimmten Zeitpunkt post infektionem gehalten.

3.4 Zellfraktionierung

Die nichtinfizierten humanen Fibroblasten wurden bis zum Erreichen einer vollständigen Konfluenz im CO₂ begasten Brutschrank bei 37°C gehalten.

Lösungen:

Zellfraktionierungspuffer A – 10 ml 0,1M NaH₂PO₄, pH 7,5

 $_{-}$ 800 μl 0,5M MgCl₂

- 1ml 0,1M CaCl₂

- 1 mM PMSF

Zellfraktionierungspuffer B – 2 ml 1M Tris/HCl, pH 9,0

- 15 μl 2M NaCl

- 10 ml 100% Glycerol

_ 1 ml 0,1M CaCl₂

- 100 μl 0,5M MgCl₂

- 800 μl 0,25M EDTA

- 500 μl 0,5% NP-40

- 0,5 mM PMSF

- 100U Trasylol/ml

Sucrose-Lösungen – 1,62 M Sucrose in Puffer A

- 0,3 M Sucrose in Puffer A

Triton X-100-Puffer – 0,5% Triton X-100 in Puffer A

Durchführung:

Das Ernten der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 10ml PBS. Sie wurden mit einem Zellschaber von dem Kulturflaschenboden abgeschabt. Das PBS beinhaltete Proteaseinhibitoren (100U Trasylol/ml und 1mM PMSF), um einer Proteolyse vorzubeugen. Die Sedimentation der Zellen erfolgte bei 1000 g für 5 min. in der Tischzentrifuge.

Die Fraktionierung der Zellen erfolgte zunächst nach folgender Methode (Radsak et al., 1990): das erhaltene Zellpellet wurde 1:10 in hypotonem Puffer A aufgenommen und 10 min. auf Eis inkubiert. Dabei wurde die Lösung hin- und wieder geschüttelt. Anschließend erfolgte das Aufschließen der Zellen im Dounce- Homogenisator, unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Bei Durchführung der Homogenisation ist ein straff sitzendes Pistill des Dounce- Homogenisators notwendig.

Durch Zugabe einer 1,62M Sucrose-Puffer A-Lösung wurde das Zellhomogenat auf eine 0,3M Endkonzentration eingestellt, dann schloss sich die Trennung in PNS (postnukleärer Überstand) und Zellkernen an. Dieser Zentrifugationsschritt erfolgte in der Tischkühlzentrífuge (Modell RT 6000D) bei 800 g für 10 min.. Das Pellet beinhaltete die Zellkerne, die noch weiteren Reinigungsschritten unterzogen wurden. Der PNS wurde im weiteren Verlauf nach löslichen- und membranösen Bestandteilen aufgetrennt (siehe unten).

Nach Abnahme des PNS, wurde zunächst das Kernpellet 1:10 in 0,3M Sucrose-Puffer A-Lösung resuspendiert und dann zweimal durch ein Sucrosekissen (3 ml 1,62M Sucrose- Puffer- A Lösung) bei 2100g für 15 min. zentrifugiert (Kühlzentrifuge Beckmann, Modell J2-21). Um die Kerne von der äußeren Membran zu befreien, wurde das Pellet 1:20 in 0,5% Triton X-100-Puffer aufgenommmen und einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1000g für 15 min. unterzogen.

An dieser Stelle wurde die Reinigung der Kerne, nach Resupension in 0,5 ml Puffer B, sowohl durch die Phasenkontrast-, als auch bei einzelnen Proben durch die Elektronenmikroskopie überprüft.

Es folgte das Aufschließen der inneren Kernmembran mit Hilfe einer Ultraschallbehandlung für 3x15 sec. bei maximaler Energie mit dem Labsonic 1510 (Braun). Da es hierbei auch zur Freisetzung der DNA kommt, so daß die Viskosität der Probe stark zunimmt, wurde eine DNAseI- Behandlung für 30 min. bei Raumtemperatur angeschlossen.

Der PNS wurde noch weiter in Zytosol und zytoplasmatische Membranen aufgetrennt, nachdem evt. noch vorhandene Kerne bei 10.000g und +4°C für 10 min. abzentrifugiert worden waren. Aus dem resultierendem Überstand wurden die zytoplasmatischen Membranen durch Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge, Modell Sorvall Combi Plus) bei 100.000g und +4°C für 60 min. sedimentiert, in 500 µl Puffer B aufgenommen und einer Ultraschallbehandlung für 3x15 sec mit dem Gerät Labsonic 1510 (Braun) unterzogen. Der Überstand stellt die eigentliche Zytosolfraktion dar. Um unlösliches Material aus der Fraktion zytoplasmatische Membranen zu entfernen, wurde nochmals bei 15000 g und +4°C für 15 min. zentrifugiert. Im Überstand befinden sich nun die abgelösten Membranbestandteile. Die Einengung der Zytosolfraktion erfolgte durch Centricons® -10 für 1 Stunde bei +4°C und 6500rpm in der Beckmann-Zentrifuge.

Die Vorgehensweise zur Zellfraktionierung bei infizierten humanen Fibroblasten erfolgte analog. Hierzu wurden die humanen Fibroblasten 72 h mit dem Laborstamm AD169 infiziert.

Die Zellfraktionierungsschritte erfolgten auf Eis, die Zentrifugationsschritte bei +4°C.

Die nach diesem Protokoll gewonnenen Fraktionen wurden nach den zuvor beschriebenen protein- und immunochemischen Methoden analysiert.

Während des experimentellen Vorgehens zeigte sich, daß dieses Fraktionierungsprotokoll ungeeignet für die Analyse radioaktiv markierter Zellen per Immunpräzipitation war. Daraufhin wurde das Protokoll folgendermaßen modifiziert:

Lösungen:

Zellfraktionierungspuffer A – siehe oben

RIPA- Puffer – 1% w/v NP 40

- 0,5% Na-Desoxycholat

-0.1% SDS

_ 150mM NaCl

- 0,05M Tris/HCl pH 8,0

- 100 IE/ml Aprotinin

1mM PMSF

Sucrose-Lösungen – siehe oben

Durchführung:

Nach dem Ernten und der Sedimentation der Zellen, wie zuvor beschrieben, bewährte es sich, die Zellen für mindestens 20 min. in hypotonem Puffer A anschwellen zu lassen. Die Voraussetzungen für eine gute Homogenisation verbessert sich hierdurch wesentlich. Analog zu dem vorangestellten Protokoll wurden die Zellen in PNS und Kerne getrennt. Vor diesem Schritt wurde etwas Homogenat abgenommen und für weitere Untersuchungen aufbewahrt. Das Kernpellet wurde ebenfalls in 0,3M Sucrose- Puffer A resuspendiert und durch ein 1,62M Sucrosekissen bei 2100g für 15 min. zentrifugiert (Kühlzentrifuge, Modell J2-21). Das erhaltene Pellet wurde in 0,3M Sucrose-Puffer A aufgenommen. Hieran schloß sich der DNAse-Verdau für 30 min. bei Raumtemperatur an. Dafür wurde eine 5mM MgCl₂-Endkonzentration eingestellt und die DNAse-Suspension (1µl/200µl Material) hinzugegeben. Für den Erhalt einer möglichst reinen Kernfraktion wurde die Zentrifugation durch das Sucrosekissen wiederholt. Dieses Kernpellet wurde in RIPA- Puffer suspendiert. Zur Schaffung vergleichbarer Pufferverhältnisse in den Fraktionen, wurden zum Homogenat und zur PNS-Fraktion entsprechende Volumina an Na- Desoxycholat, SDS, NaCl und NP-40 gegeben. Auch in diesen Fraktionen wurde der DNAse- Verdau wie in der

Kernfraktion durchgeführt. Abschließend wurde die Ultraschallbehandlung für 3x15sec. bei +4°C vorgenommen.

3.5 Immunpräzipitation

3.5.1 Zellfraktionierung für die Materialgewinnung zur Immunpräzipitation:

1) Pulse-Medium -2% (v/v) FCS

-1% (v/v) 100xL-Glutamin

 100 μCi/ml ³⁵S-Methionin-Cystein-Mix in defizientem Medium (DMEM, ohne Met, Cys, Glu)

2) Waschlösung – 1x PBS

3) Chase-Lösung – je 150 mg Methionin und

Cystein/l 1x PBS

4) Waschlösung – 1x PBS plus Inhibitoren (100U

Trasylol/ml, 1mM PMSF)

5) Chase-Medium – 2% FCS/MEM

Durchführung:

Es wurden 72 h infizierte humane Fibroblasten der Passage 17 bis 25 verwendet. Die Zellen wurden mit AD169 infiziert, die hierfür gewählte TCID₅₀ betrug 0,0125.

Nach der Entfernung des Infektionsmediums wurde zweimal mit +4°C kaltem PBS gewaschen, hiernach erfolgte die Überschichtung des Zellmonolayers mit dem radioaktiven Medium. Die Zellen wurden nun für 30 min. bei +4°C inkubiert, um in jeder Zelle einen gleichen Ausgangspool an Aminosäuren zu schaffen. Es folgte die Pulse- Markierung für 7 min. bei 37°C, der Zellmonolayer einer 550 ml

Gewebekulturflasche wurde mit 5 ml des Pulse- Mediums überschichtet, die Kulturflaschen befanden sich für die Markierung bei 37°C im Wasserbad.

Während dieser Zeit werden die ³⁵S radioaktiv markierten Aminosäuren Methionin und Cystein in die neu synthetisierten Proteine eingebaut und sind dadurch später im Szintillationszähler meßbar.

Bei der "end of pulse"- Fraktion wurde das radioaktive Medium abgesaugt und 3x für je 1 min. mit +4°C kaltem PBS, welches mit einem Überschuß an Methionin und Cystein versetzt war, gewaschen (Lösung 3). Danach erfolgte das Abkratzen der Zellen in wiederum +4°C kaltem PBS, je 10 ml pro 550 ml Gewebekulturflasche, welches die Proteaseinhibitoren PMSF und Trasylol (Lösung 4) beinhaltete. Hiermit wurden die Zellen zunächst zweimal gewaschen, darin abgekratzt und durch Zentrifugation bei 1000 g pelletiert. Dieses Zellpellet wurde in hypotonem Puffer A aufgenommen und für 20 min. darin inkubiert.

Die Zellen, welche einem "Chase" (weitere Inkubation in Abwesenheit radioaktiver Aminosäuren) unterzogen wurden, befanden sich für ihre jeweilige "Chase-Zeit" im 37°C warmen Wasserbad. Hierfür wurde mit Lösung 3 gewaschen und nachfolgend der Zellmonolayer mit "Infektionsmedium" (10ml/550ml Gewebekulturflasche) bedeckt (Lösung 5). Nach Ende der "Chase-Zeit" wurden die Kulturflaschen sofort auf Eis überführt, das Chase-Medium abgenommen und der Zellmonolayer 2x mit je 10ml +4°C kalter Lösung 4 gewaschen. Hierin wurden die Zellen per Zellkratzer abgeschabt. Zur Gewinnung des Zellpellets wurde für 10 min. bei 2000rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann analog zur Fraktion "end of pulse" weiterbehandelt.

Die Homogenisation erfolgte durch einen Dounce-Homogenisator. Nach 25 Homogenisationsschritten wurde der Zellaufbruch lichtmikroskopisch überprüft und gegebenenfalls fortgesetzt. Von diesem Zellhomogenat wurde eine Probe abgenommen. Aus dem restlichen Homogenat wurden der PNS und die Kernfraktion gewonnen, als Protokoll diente das modifizierte Zellfraktionierungsprotokoll (siehe Abschnitt 3.4).

Es folgten die Bestimmung der säuregefällten Radioaktivität und der Proteinkonzentration durch den Bicinchoninsäure- Assay, wobei hierfür die Proben zunächst einer TCA- Fällung unterzogen wurden, um die störenden Detergenzien und Salze zu eliminieren.

3.5.2 Bestimmung der säuregefällten Radioaktivität

Hierfür wurden von der Kern- bzw. Zytosolfraktion jeweils Doppelbestimmungen angefertigt. Auf 3MM Whatman Filterplättchen wurden je 5µl Probe aufgetragen und getrocknet. Die Filterplättchen wurden nun eisgekühlt 30 min. in 10% TCA zur Fällung der Proteine und zweimal in 10% TCA für jeweils 10 min. geschüttelt, um anschließend kurz in 100% eiskaltem Ethanol geschwenkt und schließlich getrocknet zu werden. Die sehr gut getrockneten Filterplättchen wurden in Szintillationsröhrchen überführt, mit 2ml Szintillationsflüssigkeit bedeckt und zur Messung ihrer Aktivität in den Szintillationszähler gestellt.

Anhand der erhaltenen Werte ließen sich die Beziehungen Radioaktivität/µg Protein errechnen und damit besser abschätzen, welche Proteinmenge für die Immunpräzipitation notwendig war. Hierbei war durch Vorversuche bekannt, daß 250000 cpm bei der Immunpräzipitation des Zytosols für eine gute Darstellung ausreichen.

3.5.3 Herstellung der 1:1 Protein- A- Sepharose- Suspension

Das Protein- A stammt aus dem Bakterium Staphylococcus aureus, hat eine Molekularmasse von 42 kDa und ist an Sepharose gekoppelt. Es bindet an die FC-Region vieler Immunglobuline und lässt die Antigenbindungsstelle der Antikörper unbeeinträchtigt. Daher ist es möglich mit Hilfe spezifischer Antikörper Proteine aus den Zellfraktionen zu isolieren.

Für jede Probe wurden 25mg Protein- A- Sepharose CL-4B (Fa. Sigma, Deisenhofen) abgewogen und mit 100mM Tris-HCl, pH 7,5 auf das 10x Volumen gebracht. Nach einer 1h Inkubation bei RT wurde 2x mit je 2ml 100 mM Tris- HCl, pH 7,5 gewaschen. Hiernach wurde die Protein- A- Sepharose in 100 mM Tris- HCl, pH 7,5 bei +4°C aufbewahrt. Vor der Verwendung wurde die Protein- A- Sepharose durch 3x Waschen mit Wasch-Puffer A equilibriert. Um eine 1:1 Sepharose-Suspension zu erhalten, wurde das Volumen an Wasch-Puffer A nach Beendigung der Equilibrierungsschritte zugegeben, um welches die Sepharose gequollen war. Zur orientierenden Quantifizierung dieses Volumens diente die Skalierung auf den Eppendorfreaktionsgefäßen.

3.5.4 Immunpräzipitation aus Zellfraktionen

Lösungen:

1) Wasch-Puffer A – 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

- 150 mM NaCl

- 0,5% NP-40

- 5 mM EDTA

2) Wasch-Puffer B – 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

- 500 mM NaCl

- 0,5% NP-40

- 5 mM EDTA

3) Wasch-Puffer C – 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

4) Protein-A-Sepharose CL-4B – 1:1 Protein-A-Sepharose-

Suspension in Wasch-Puffer A (s.

u.)

5) Antiserum – BGE1 (α -pp65)

6) Laemmli- Probenpuffer

7) Fixierungslösung -20% (v/v) Isopropanol

- 12% (v/v) Essigsäure

Durchführung:

Durch die Immunpräzipitation werden Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper aus den Zellfraktionen isoliert. Das an Sepharose gekoppelt Protein- A bindet die Antikörper über die konstante Fc- Region und lässt die Antigenbindungsstelle der Antikörper dabei unbeeinflusst.

Für die vergleichende Immunpräzipitation aus mehreren Fraktionen wurden Proben mit gleicher Proteinkonzentation eingesetzt. Jede der Proben wurde mit Waschpuffer

A zu einem Volumen von 500µl aufgefüllt. Zur Präadsorption wurde jede Probe mit 50µl Protein- A- Sepharose- Suspension 4) versetzt und für 30 min. bei Raumtemperatur drehend inkubiert. Danach wurde die Sepharose durch hochtourige Zentrifugation für 1 min. pelletiert, der erhaltene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit dem entsprechenden Antiserum 5) versetzt (5µl BGE-1/500 µl Probenvolumen). Es schloß sich eine Inkubation auf dem Rotationsinkubator bei Raumtemperatur für 3 Stunden an. Zu jeder Probe wurden dann 50µl Protein- A- Sepharose- Suspension 4) gegeben und drehend über Nacht bei +4°C inkubiert. Hiernach wurde das Pellet durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x mit Waschpuffer A 1) und je 1x mit Waschpuffer B 2) und C 3) gewaschen. Zur SDS-PAGE Analyse wurden die Präzipitate in 30µl 2x reduzierendem Laemmli- Puffer 6) aufgenommen und für 5 min. bei 95°C aufgekocht. Hieran schloß sich eine kurze Zentrifugation für 10 sec. an. Der Überstand konnte nun mit Hilfe einer Haemilton-Pipette auf das 10bzw.12,5% Gel mit einer Dicke von 1,5 mm aufgetragen werden. Es wurde der gefärbte Proteinmarker "low range prestained" der Firma Bio-Rad mitgeführt. Als Initialspannung wurden 80 V für 15 min. gewählt, dann wurde die SDS-PAGE bei 130 V für 120 min. fortgesetzt. Um die Proteine im Gel zu fixieren, wurden sie für 1h im Fixierungsmittel 7) inkubiert. Hieraufhin folgte das Trocknen der Gele im Geltrockner für 2h bei 80°C. Die Gele befanden sich dabei auf 3MM-Whatman Papier, welches hierfür mit H₂O befeuchtet wurde. Anschließend wurden die Gele mit einer Phosphorimagerplatte für 3 Tage exponiert, um die immunpräzipitierten und entsprechend ihrer molekularen Größe aufgetrennten Proteine radiologisch auswerten zu können.

Die Quantifizierung der Banden erfolgte am Phosphoimager. Zur Bestimmung der Bandenintensität wird um diese ein Rechteck gezogen und die Intensität in der Einheit PSL (phosphostimulated luminescence) gemessen. Ein Rechteck gleiche Größe wird zur Bestimmung der Hintergrundintensität in gleicher Höhe zur zu bestimmenden Bande gesetzt. Die Berechnungen erfolgen computergestützt.

3.6 Transfektion

Während der pulse- chase Versuche zeigte sich, dass der intrazelluläre Transport des pp65 schwer zu quantifizieren war. Daher schlossen sich Transfektionsversuche an, um die Aufnahme des Phosphoproteins und dessen Kinetik im Zellkern morphologisch darzustellen.

Bei der Transfektion wird heterologe DNA in Zellen eingeschleust. Die Gene die auf dem einzuschleusendem Vektor liegen, werden in der Zelle durch zelluläre Enzyme transkribiert und translatiert.

Die Versuche wurden mit dem Fusionsprotein aus pp65 und dem grün fluoreszierendem Protein (GFP) durchgeführt. Das GFP ist ein Protein der Qualle Aequora victoria, welches unter entsprechender Anregung grün fluoresziert. Auf grund der Transfektion mit dem Fusionsprotein aus pp65 und dem GFP bedeutet dies, dass alle unter dem Fluoreszenzmikroskop grün aufleuchtenden Strukturen pp65 beinhalten. Dieses Konstrukt befand sich im nicht induzierbarem pcDNA3.1 Expressionsvektor (Fa. Invitrogen) unter Kontrolle des konventionellen HCMV-Promotors (major- immediate early promotor- enhancer).

Der eingesetzte Vektor mit dem Fusionsprotein wurde uns von Prof. Dr. Britt von der Oregon Sciences University in Portland, USA, zur Verfügung gestellt.

Die HFF-Zellen wurden auf Gewebekulturschalen (∅ 6cm) bis zum Erreichen eines konfluenten Zellmonolayers bei 37°C im CO₂ begasten Brutschrank kultiviert.

Lösungen:

- 1) Fibroblasten- Kulturmedium (MEM, 10% FCS)
- 2) pp65/GFP (Fusionsprotein aus pp65 und grün fluoreszierendem Protein)
- 3) PEI (Polyethylenimin) (9mg/10ml H₂O)
- 4) 150mM NaCl

Durchführung:

Zur Herstellung der Transfektionskomponenten wurde mit 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen gearbeitet. Zunächst erfolgte der getrennte Ansatz von 10µg DNA

(Lösung 2) in ein Reaktionsgefäß und von 100μl PEI (Lösung 3) in ein anderes. Beide wurden mit 150mM NaCl- Lösung auf ein Endvolumen von 750μl aufgefüllt. Es schloß sich eine Inkubation für 10 min. bei RT an. In der Zwischenzeit wurde das Medium der HFF-Kulturen abgenommen und jede 6 cm Ø Kulturschale mit 2,5 ml frischem Medium (Lösung 1) überschichtet.

Nach abgeschlossener Inkubationszeit der Transfektionskomponenten wurde in den Reaktionsgefäßen mit der PEI- Lösung gut resuspendiert und dann diese Lösung tropfenweise zur DNA-Lösung gegeben. Nach Beendigung einer nochmaligen 10 min. Inkubationszeit bei RT wurde das Transfektionsmedium gut gemischt und zu jeder Kulturschale je 500µl tropfenweise dazugegeben. Nach 6 stündiger Inkubation im 5% CO₂ begastem Brutschrank bei 37°C erfolgte ein erneuter Mediumwechsel, die Kulturen wurden nun mit je 5ml Medium (Lösung 1) überschichtet. Nach etwa 12 Stunden wurde der Transfektionserfolg mikroskopisch überprüft (durch Nachweis intranukleär gelegener grün fluoreszierender granulärer Strukturen).

Die Auswertung der Fluoreszenintensität erfolgte computergestützt mit dem AIDA-Programm der Fa. Raytest.

3.7 Elektronenmikroskopie:

Lösungen:

- 1) Paraformaldehyd-Stammlösung (25%) 25g Paraformaldehyd in 60ml aq. dest. unter Erhitzen (60°C) lösen
 - 2-3 Tropfen 1N NaOH zugeben nach Abkühlen filtrieren und auffüllen auf 100ml
- 2) Fixans nach Ito (1968): 2,5% (w/v) Paraformaldehyd aus Lösung 1)
 - 2,5% (w/v) Glutaraldehyd
 - 0,05% (w/v) Pikrinsäure
 - 0,1M Cacodylatpuffer pH 7,35

3) Cacodylatpuffer: - 0,1M Na-Cacodylsäure (Dimethylarsinsäure) pH 7,35 4) Osmiumtetroxid-Fixierlösung - 2% (w/v) Osmiumtetroxid in aq. dest. - 3% (w/v) Kaliumferrocyanat Gebrauchslösung von 1:1. herstellen 5) Ethanol p. A. - 50%, 70%, 90% und 100% 6) Propylenoxid 7) Eponlösungen - Lösung A: 62ml Glycidether 100ml Dodecenylbernsteinsäureanhydrid - Lösung B 100ml Glycidether 89ml Methylnadicanhydrid 8) Härter -2,4,6-Tris(Dimethylaminomethyl)phenol 9) Blockkontrastierung - Uranylacetat (0,3%-ig in Maleatpuffer, pH 5,0) - 50% Ethanol im Verhältnis 1:1 mischen 10) Färbelösung nach Richardson in - 0,5% Azur II aq. dest. - 0,25% Methylenblau - 0,25% Borax

11) Bleicitratlösung nach Reynolds – 1,33g Pb(NO₃)₂

1,76g Na₃(C₆H₅O₇) x 2 H₂O
 Substanzen in 30ml aq. dest.
 einwiegen, gut schütteln, 30min.
 stehen lassen und dann 8ml
 1N NaOH zusetzen

Durchführung:

Die Proben der elektronenmikroskopisch zu untersuchenden Zellfraktionen wurden zunächst für 30min. in Ito-Fixans 2) in einem Volumenverhältnis von 1:1 bei RT fixiert. Es erfolgte das Pelletieren der Proben bei high speed in der Tischkühlzentrifuge bei 4°C für 20min.. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet wurde in 1000µl sterilem Cacodylatpuffer 3) aufgenommen, gevortext und nochmals in der Tischkülzentrifuge für 3min. bei high speed pelletiert. Dieser Waschschritt wurde 1x wiederholt. Die Proben wurden bis zur Aufarbeitung für die Schnitte bei 4°C aufbewahrt.

Die Zellen wurden zur Nachfixierung mit reduzierendem Osmium 4) für 60 Minuten bei 4°C versetzt. Hiernach wurde mit aq. dest. dreimal gespült und es erfolgte die Blockkontrastierung für 10 Minuten mit Lösung 8). Die Entwässerung der Zellen und Einbettung in Epon erfolgte nach folgendem Schema:

Ethanol 50%	2x10 min
Ethanol 70%	2x10 min
Ethanol 90%	2x10 min
Ethanol 100%	2x10 min
Propylenoxid	2x10 min
Propylenoxid/Epon (1:1)	1x60 min.
Epon	über Nacht

Zur Herstellung der Epon Gebrauchslösung wurden Lösung A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und solange mit einem Glasstab verrührt, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Hiernach wurden auf 10ml Mischung 200µl Härter 8) gegeben und ebenfalls solange gerührt, bis die Lösung homogen war.

Nach Einbettung der Proben in Epon erfolgte am nächsten Tag erneut das Ansetzen einer homogenen blasenfreien Epon-Lösung zur Einbettung der Zellen in Gelatinekapseln. Hierfür wurde zunächst ein Tropfen des Epon in die Gelatinekapsel gegeben, hierauf wurde ein Teil des Zellpellets mit Hilfe einer Nadel gegeben. Die Gelatinekapsel wurde mit Epon aufgefüllt und in den Brutschrank bei 60°C für 48 Stunden zum Auspolymerisieren gegeben.

Zur Herstellung der Schnitte wird die Gelatine von den jetzt ausgehärteten Blöckchen mittels heißem Wasser abgelöst. Die Blöckchen wurden unter einer Stereolupe mit einer Rasierklinge zugespitzt, auf dem Ultramikrotom wurden 1µm dicke Schnitte unter Verwendung von Glasmessern angefertigt und auf Glasobjektträger aufgebracht. Es folgte nun die Färbung nach Richardson, indem die Semidünnschnitte auf einer Wärmeplatte (ca. 40°C) mit der Färbelösung 10) für 10-15 Sekunden überschichtet und mit aq. dest. gespült wurden. Lichtmikroskopisch orientierend an den angefertigten Semidünnschnitten wurden die Blökchen weiter auf den gewünschten Bereich zugespitzt und nun Ultradünnscnitte (60nm) auf dem Mikrotom bei thermischen Vorschub und mit einem Diamantmesser angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Netze, die zuvor in Aceton gespült wurden aufgebracht. Es erfolgte jetzt die Bleicitrat-Kontrastierung 11) der Schnitte auf den Netzen für 5 Minuten hieran schloß sich ein Waschschritt mit aq. dest. an. Nach dem Trocknen der Schnitte für etwa eine Stunde konnte die elektronenmikroskopische Auswertung durchgeführt werden mit kombinierter Fotodokumentation.

4 Ergebnisse

4.1 Standardisierung der Zellfraktionierung von HFF-Zellen

Zur Untersuchung der intrazellulären Kinetik des Tegumentproteins pp65 ist die Herstellung von möglichst reinen Kern- und Zytosolfraktionen notwendige Voraussetzung.

Zur Kultivierung und Infektion wurden, wie bereits beschrieben, primäre Vorhaut-Fibroblasten verwendet. Die Untersuchungen an infizierten HFF-Zellen wurden 72 Stunden post infektionem (p.i.) durchgeführt.

4.1.1 Modifikation der Zellfraktionierung

Bevor die Zellfraktionierung modifiziert wurde, wurden HCMV- infizierte humane Fibroblasten, als auch nicht HCMV- infizierte humane Fibroblasten entsprechend den Ausführungen in Abschnitt 3.4 behandelt. Die Fraktionen von nicht HCMV-infizierten humanen Fibroblasten dienten als Negativkontrolle und wurden zu allen Untersuchungen mitgeführt.

Wie aus dem Zellfraktionierungsprotokoll aus Abschnitt 3.4 hervorgeht, erfolgte nach Homogenisation das Aufschließen der Zellen in die Fraktionen: Zellkern, zytoplasmatische Membranen und lösliche Zytosoloproteine. Vom Homogenat wurde jeweils eine kleine Probe abgenommen und aufbewahrt.

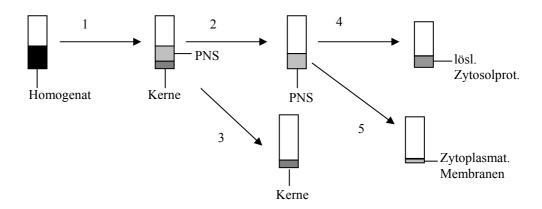


Abb.: 4.1 Skizze zur Zellfraktionierung:

1 durch die Zentrifugation in der Tischkühlzentrifuge bei 2000 rpm, 10 min. pelletieren die Zellkerne

² und 3 nach Abnahme des PNS werden die Zellkerne nach dem Protokoll weiter aufgearbeitet

⁴ und 5 Auftrennung des PNS in lösliche Zytosolproteine und zytoplasmatische Membranen

Ziel der Zellfraktionierung war der Erhalt möglichst reiner Fraktionen, d. h. eine Kernfraktion ohne Bestandteile aus dem Zytosol und ebenso zytoplasmatische Fraktionen ohne Zellkernanteile. Dies wurde immunologisch mittels Antikörper getestet. Für den Nachweis reiner Fraktionen in der Western- Blot- Analyse wurden folgende Antiseren eingesetzt: für die Kernfraktion α - Lamin B, für die Membranproteine α -TRAM (für translocating chain- associating membrane protein, Görlich et al., 1992) und für die löslichen Zytosolproteine α - LDH (Abb.: 4.2 bis 4.3).

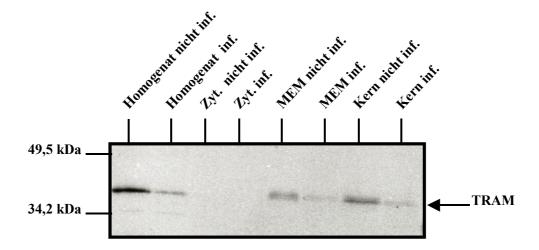


Abb.: 4.2: Western- Blot- Analyse von infizierten und nicht infizierten humanen Fibroblasten, 72 Stunden nach Infektion, in den Fraktionen: Homogenat, Zytosol (Zyt), Kern und Membranproteine (MEM). Pro Fraktion wurden 50µg Protein eingesetzt. Nach Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe in der SDS- PAGE, in einem 12,5% Gel (s. 3.1.1) erfolgte das Blotten der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (3.1.4). Zur Analyse der jeweiligen Fraktion erfolgte der Einsatz von Antikörpern gegen Markerproteine.

Zur Detektion von Membranproteinen ist hier ein Antikörper gegen das membranständige Glykoprotein TRAM eingesetzt wurden.

Antikörper: α- TRAM (1:200), α- Kanninchen-HRP-gekoppelt (1:1000)

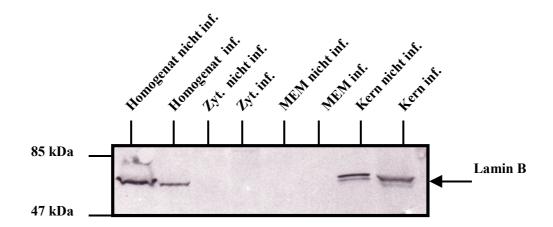


Abb.: 4.3: Western- Blot- Analyse von infizierten und nicht infizierten humanen Fibroblasten, 72 Stunden nach Infektion, in den Fraktionen: Homogenat, Zytosol (Zyt), Kern und Membranproteine (MEM). Pro Fraktion wurden 50µg Protein eingesetzt. Die Auftrennung der Proteine in der SDS- PAGE erfolgte in einem 10% Gel (s. 3.1.1)

Zur Detektion von Proteinen des Kerns ist hier ein Antikörper gegen das in der Kernhülle lokalisierte Lamin B eingesetzt wurden.

Antikörper: α- Lamin B (1:40); α- Maus- HRP- gekoppelt (1:1000)

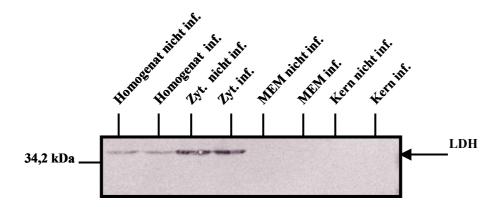


Abb.: 4.4: Western- Blot- Analyse von infizierten und nicht infizierten humanen Fibroblasten, 72 Stunden nach Infektion, in den Fraktionen: Homogenat, Zytosol (Zyt), Kern und Membranproteine (MEM). Pro Fraktion wurden 50µg Protein eingesetzt. Zur Auftrennung der Proteine in der SDS- PAGE wurde ein 12,5% Gel angefertigt (s. 3.1.1.)

Zur Detektion von löslichen Zytosolproteinen ist hier ein Antikörper gegen LDH eingesetzt wurden.

Antikörper: α- LDH (1:500); α- Ziege- HRP- gekoppelt (1:2000)

Die Abb. 4.2 bis 4.4 veranschaulichen Western- Blot- Analysen zur Kontrolle des Vorliegens reiner Fraktionen. Aufgezeigt sind Kern-, Membranproteine (MEM)-, lösliche Zytosolproteine (Zyt.)- und Homogenat- Fraktion von jeweils HCMV-infizierten humanen Fibroblasten 72h p.i. und nicht infizierten humanen Fibroblasten.

Deutlich erkennbar in Abb. 4.2 sind Banden im Bereich von 36 kDa in den Fraktionen Homogenat-, Kern- und Membranproteine infizierter-, als auch nicht infizierter humaner Fibroblasten. Nicht erkennbar ist diese Bande in den Fraktionen lösliche Zytosolproteine. Da der Western Blot mit einem Antiserum gegen das membranständige Glykoprotein TRAM inkubiert wurde, kann man auf das Vorliegen einer reinen Zytosolfraktion schließen.

In der Abb. 4.3 sind Banden in Höhe von 64 kDa in den Homogenat- und Kernfraktionen infizierter, als auch nicht HCMV- infizierter Zellen detektiert wurden. Diese ist nicht nachweisbar in den Fraktionen lösliche Zytosolproteine und Membranproteine. Die Inkubation dieses Western Blots erfolgte mit einem Antiserum gegen Das Kernhüllenprotein Lamin B.

Die in der Abb. 4.4 zu detektierenden Banden im Bereich von 30 kDa, nach Inkubation mit einem Antiserum gegen das Zytosolprotein LDH sind zu finden in den Fraktionen Homogenat und lösliche Zytosolproteine, nicht aber in den Kern- und Membranproteinfraktionen.

Aus diesen Ergebnissen konnte auf das Vorliegen qualitativ reiner Fraktionen geschlossen werden.

In den Immunpräzipitationen erwies sich die Auftrennung gemäß oben aufgeführtem Zellfraktionierungsprotokoll mit Aufschlüsselung der zytoplasmatischen Bestandteile in Membranproteine und lösliche Zytosolproteine als nicht weiter durchführbar. Denn um eine ausreichende Signalintensität immunpräzipitierenden pp65 in der Fraktion lösliche Zytosolproteine zu erhalten, musste eine Radioaktivität von mindestens 500000 cpm eingesetzt werden. Dies bedeutet, ein entsprechend großes Volumen einengen zu müssen, so daß die korrespondierende Proteinkonzentration auf das SDS-Gel aufgetragen werden kann. Zur Ankonzentrierung des Proteins wurden vergleichende Immunpräzipitationen nach: Wessel-Fällung, TCA- Fällung und Einengung über "Centricon 10" durchgeführt.

Die durch die Wessel- Fällung eingeengten Proben ließen sich nicht immunpräzipitieren. Ursache können die noch vorhandenen Salze aus den Zellfraktionierungspuffern sein, die durch jene Fällung nicht eliminiert werden. Es ist vorstellbar, dass die Salze die Bindung zwischen Antigen und Antikörper und damit die Immunpräzipitation stören. Weiterhin löste sich das nach der Wessel-Fällung erhaltene Pellet sehr schlecht im RIPA- Puffer, also auch in diesem Schritt kann ein Proteinverlust der zu untersuchenden Probe aufgetreten sein. Durch das Einengen der Fraktion lösliche Zytosolproteine über Zentrifugation durch Centricons® konnte ein Verlust an Radioaktivität nicht ausgeschlossen werden. Die TCA- Fällung scheint im Vergleich die optimale Methode zu sein.

Unabhängig von oben dargelegter Problematik kein geeignetes Verfahren zur Einengung der Fraktion lösliche Zytosolproteine gefunden zu haben, verlangt die Untersuchung der löslichen Zytosolproteine auf die Kinetik des pp65, hohe Mengen an Ausgangsmaterial, inklusive einer entsprechend hohen Menge an Radioaktivität. Dies war ausschlaggebend dafür, oben aufgeführtes und in Abschnitt 3.4 näher erläutertes Zellfraktionierungsprotokoll zu modifizieren. Die Auftrennung der Zellen wurde deshalb auf die Fraktionen Zellkerne und postnukleärer Überstand reduziert.

Auch die durch das jetzt modifizierte Zellfraktionierungsprotokoll erhaltenen Fraktionen wurden immunologisch durch Western- Blot- Analysen in ihrer Reinheit überprüft (siehe Abschnitt 4.1.3)

Zuvor erfolgte die Homogenisation der HCMV- infizierten humanen Fibroblasten und der nicht infizierten humanen Fibroblasten unter licht- und elektronenmikroskopischer Kontrolle. Hierfür wurde jeweils ein Aliquot des Homogenats nicht infizierter, als auch HCMV- infizierter humaner Fibroblasten abgenommen und aufbewahrt. Die Homogenisationsergebnisse wurden fotografisch dokumentiert (s. 4.1.2).

4.1.2 Morphologische Analyse der Zellfraktionierung

4.1.2.1 Lichtmikroskopische Analyse der Zellfraktionen

Vor Homogenisierung fielen lichtmikroskopisch zytopathisch veränderte HCMV infizierte HFF-Zellen auf. Zum Teil lagen diese in Zellhaufen dicht gedrängt beieinander (s. Abb. 4.6). Typisch für HCMV- infizierte Zellen ist deren Zellvergrößerung, dies wird im Vergleich mit Abb. 4.5 deutlich. Nach 10 Homogenisationsschritten zeigten die lichtmikroskopischen Kontrollen das Aufbrechen der Zellhaufen, es können jetzt einzelne in kleinen Gruppen lokalisierte infizierte humane Fibroblasten gesehen werden. Nach 25 Homogenisationsschritten ist kaum noch eine intakte Zelle zu finden, einzelne isolierte Zellkerne liegen vor, aber auch Zellkerne mit noch sichtbarem Zytoplasmasaum (s. Abb. 4.7 u. 4.8).

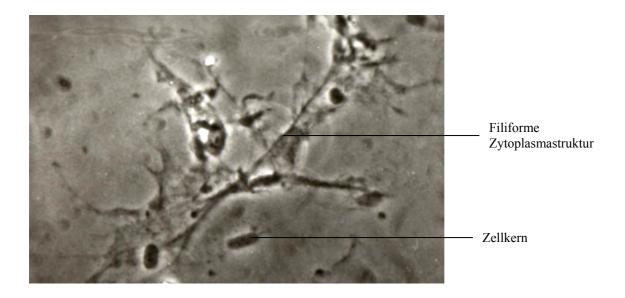
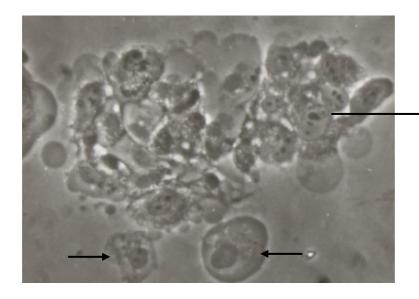


Abb.: 4.5:Lichtmikroskopie der Fraktion von nicht infizierten humanen Fibroblasten, in Suspension vor der Homogenisierung. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von dem Kulturflaschenboden abgeschabt, das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in hypotonem Puffer A aufgenommen (s. 3.4). Deutlich erkennbar sind die Fibroblasten mit ihren filigranen Zellausläufern.

Vergrößerung: 1:100



deutlich vergrößerte Zelle, insbesondere imponieren die zellulären Einschlusskörperchen nach HCMV- Infektion (sog. "Eulenaugenzelle"), s. Pfeile

Abb.4.6: Lichtmikroskopie der HCMV infizierten HFF-Zellen 72h p.i.,vor Homogenisierung. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von dem Kulturflaschenboden abgeschabt, das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in hypotonem Puffer A resuspendiert. Die Zellen zeigen typische Veränderungen nach HCMV-Infektion: Zellvergrößerung, Zellkernvergrößerung, typisch ist die Anordnung in Zellhaufen im Vergleich zu Abb.: 4.5: nicht inf. HFF Vergrößerung: 1:100

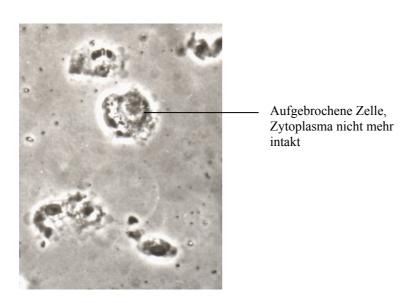


Abb.4.7: Lichtmikroskopie nach 10 Homogenisationsschritten HCMV infizierter HFF-Zellen 72h p.i., die Zellen liegen in Puffer A vor. Beginn des Aufbruchs der infizierten Zellen Vergrößerung: 1:100

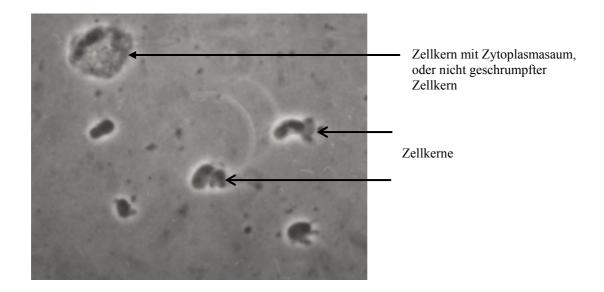


Abb. 4.8:Lichtmikroskopie nach 25 Homogenisationsschritten HCMV infizierter HFF-Zellen 72h p.i., die Zellen liegen in Puffer A vor. Aufgebrochene Zellen mit anscheinend freien Zellkernen, allerdings stark geschrumpft. Aber auch Zellkerne mit noch anhaftendem Zytoplasma oder nicht geschrumpfte Zellkerne sind zu erkennen. Zur besseren Differenzierung folgte ein weiterer Aufreinigungsschritt und die Kernfärbung mit dem Hoechst- Farbstoff (s. Abb. 4.9 und 4.10).

Vergrößerung: 1:100

Die Auftrennung des Homogenats in Zellkerne und PNS erfolgte, wie oben bereits aufgezeichnet.

Die Kernfraktion wurde nach dem 2. Zentrifugationsschritt durch das 1,62M Sucrosekissen mikroskopisch beurteilt. Lichtmikroskopisch (s. Abb.:4.9) konnte keine Aussage über das Vorhandensein von reinen Kernen getroffen werden.

Deshalb wurde die Anfärbung der Kerne mit dem Hoechst-Farbstoff (Einsatz 1:1000) vorgenommen. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA, durch seine fluoreszierende Eigenschaft sind Kerne fluoreszenzmikroskopisch beurteilbar. Hierbei konnte festgestellt werden, daß die Kernfraktion Kerne beinhaltet, die teilweise geschädigt und teilweise geschrumpft waren (s. Abb. 4.10).

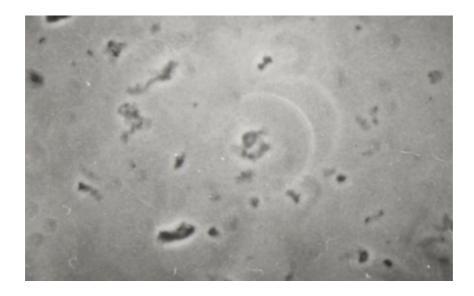


Abb.4.9: Lichtmikroskopie nach dem 2. Zentrifugationsschritt durch das 1,62M Sucrosekissen HCMV infizierter HFF-Zellen 72h p. i.. Eine Aussage über das Vorliegen von Zellkernen oder gar reinen Zellkernen ist nicht möglich, wahrscheinlich wurden diese durch die Aufreinigungsschritte zerstört.

Vergrößerung: 1:100

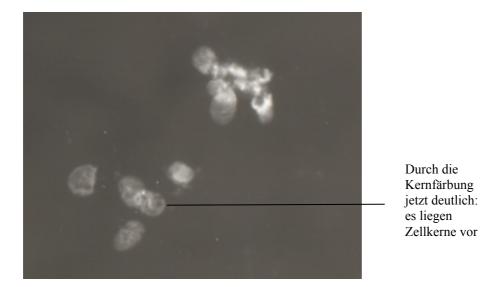


Abb.4.10: Korrespondierendes Fluoreszensbild zu Abb. 4.9. Lichtmikroskopie nach dem 2. Zentrifugationsschritt durch das 1,62M Sucrosekissen HCMV infizierter HFF-Zellen 72h p. i. Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff. Hierdurch ist die Aussage über das Vorliegen von Zellkernen nach abgeschlossener Zellfraktionierung möglich. Die Zellkerne sind geschrumpft, aber nicht zerstört. Vergrößerung: 1:500

4.1.2.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Zellfraktionen

Wie im vorangegangenem Abschnitt beschrieben erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung der einzelnen Zellfraktionierungsschritte. Diese Veränderungen wurden nun auch elektronenmikroskopisch untersucht und fotodokumentiert (s. unten).

Festzustellen waren im Homogenat HCMV- infizierter HFF 72h p.i. intakte infizierte HFF-Zellen. Die erkennbaren elektronendichten Strukturen im Zytoplasma sind dense bodies, als Zeichen der erfolgten HCMV- Infektion (s. Abb. 4.11).

Die Aufnahmen nach 10 und 25 Homogenisationsschritten zeigen intakte Kerne, dense bodies, verschiedene Kapsidformen und zytoplasmatisches Material.(s. Abb. 4.12 bis 4.16).

Die Kernfraktion wurde ebenfalls elektronenmikroskopisch nach dem 2. Sucrosekissen analysiert. Hierbei konnte festgestellt werden, daß die Fraktion nicht vollständig von zytoplasmatischem Material befreit werden konnte. Weiterhin scheint die Kernmembran nicht mehr intakt zu sein. Das paranukleäre Material kann so auch Karyoplasma mit beinhalten (s. Abb. 4.15). Im Vergleich zu infizierten Zellen ist in Abb. 4.16 die Kernfraktion nicht infizierter humaner Fibroblasten aufgezeigt, ebenfalls nach dem Zentrifugationsschritt durch das 2. Sucrosekissen, auch um diese Zellkerne liegt homogenes Material.

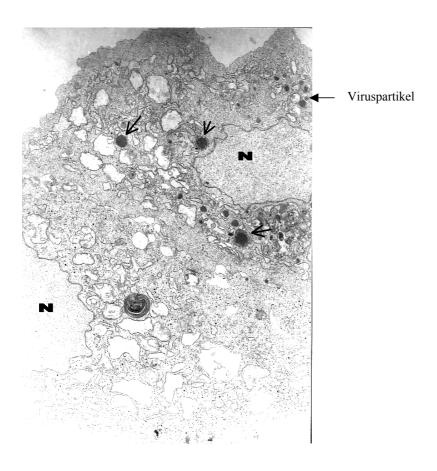


Abb. 4.11: Elektonenmikroskopie HCMV infizierter humaner Fibroblasten 72h p.i. vor Homogenisation. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von dem Kulturflaschenboden abgeschabt, das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in hypotonem Puffer A aufgenommen (s. 3.4). Die Aufnahme zeigt zwei Zellen mit ihren Zellkernen (N). Mit den Pfeilen sind dense bodies markiert. Insbesondere in der oberen Zelle sind Viruspartikel, im Zytoplasma lokalisiert, zu erkennen.

Vergrößerung: 1900 fach

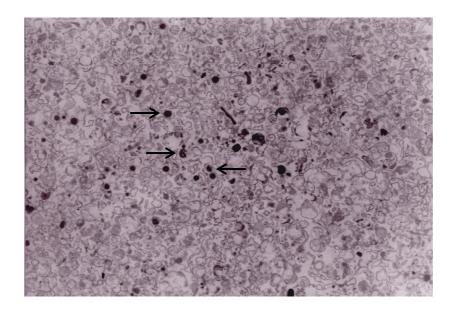


Abb.: 4.12: Elektonenmikroskopie nach 10 Homogenisationsschritten HCMV infizierter humaner Fibroblasten 72h p. i. Die Zellen liegen in Puffer A vor. Hier gezeigt sind Vesikel unterschiedlicher Größe und Viruspartikel. Insbesondere die dense bodies erscheinen elektronendicht (Pfeile). Vergrößerung: 8000 fach

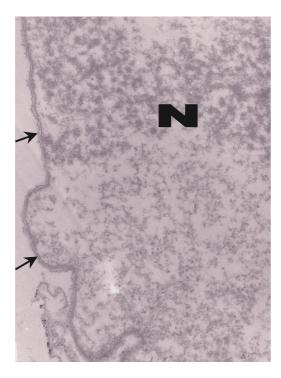


Abb.: 4.13 Elektonenmikroskopie nach 10 Homogenisationsschritten HCMV infizierter humaner Fibroblasten 72h p. i. Die Zellen liegen in Puffer A vor. Gezeigt ist ein Zellkern (N), die Pfeile weisen zum perinukleären Raum. Im unteren linken Anteil der Abbildung befinden sich Reste von Zytoplasma.

Vergrößerung: 27500 fach

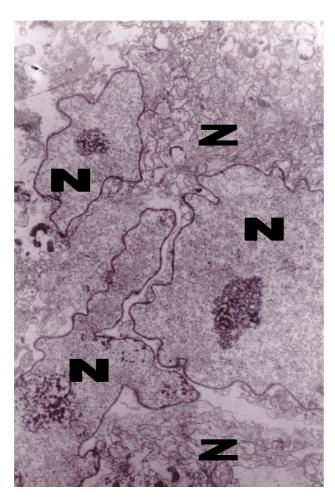


Abb.: 4.14 Elektonenmikroskopie nach 25 Homogenisationsschritten HCMV infizierter humaner Fibroblasten 72h p. i. Die Zellen liegen in Puffer A vor. Gezeigt sind 3 Zellkerne (N), sowie Anteile von Zytoplasma (Z). Die Zellen sind nach 25 Homogenisationsschritten aufgebrochen.

Vergrößerung: 1900 fach

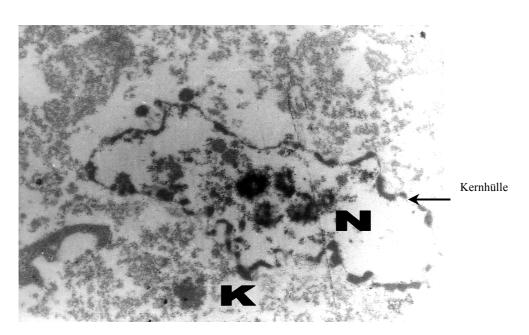


Abb.: 4.15: Elektronenmikroskopie nach dem 2. Zentrifugationsschritt durch das 1,62 M Sucrosekissen von HCMV infizierten humanen Fibroblasten 72h p.i.. Die Kernmembran des Zellkerns (**N**) scheint teilweise durchlöchert zu sein. Die mit (**K**) bezeichnete Struktur könnte ausgetretenes Karyoplasma darstellen. Der Pfeil zeigt auf die Kernhülle.

Vergrößerung: 8000 fach

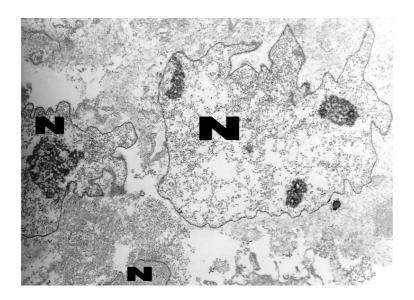


Abb.: 4.16 Elektonenmikroskopie der Kernfraktion nach 25 Homogenisationsschritten nicht infizierter humaner Fibroblasten. Die Zellen liegen in Puffer A vor. Insgesamt sind im Bildausschnitt 3 Zellkerne (N) zu erkennen. Das paranukleäre Material könnte Zytoplasma als auch ausgetretenes Karyoplasma sein.

Vergrößerung: 1900 fach

In den hier dargestellten elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte das Vorhandensein von Zellkernen nach den 25 Homogenisationsschritten und weiterer Aufarbeitung der Fraktionen entsprechend des modifizierten Zellfraktionierungsprotokolls nachgewiesen und dokumentiert werden. Entspechend des modifizierten Protokolls wurde das Kernpellet nach dem 2. Zentrifugationsschritt durch das 1,62 M Sucrosekissen sofort in den für die Immunpräzipitation nötigen RIPA- Puffer aufgenommen (siehe Erläuterungen unter 4.2.1.1 und 3.4)

In der Elektronenmikroskopie scheint es nicht zu einer vollständigen Entfernung des Zytoplasmas gekommen zu sein. Auch ist zu diskutieren, ob die Zellkerne durch die Zellfraktionierung so geschädigt wurden, dass das paranukleäre Material auch Nukleoplasma sein könnte. Die zytoplasmatischen Reste in der Kernfraktion können zur Ergebnisbeeinträchtigung führen, da keine vollständig reine Kernfraktion vorliegt. Ursache dieser zytoplasmatischen Anhängsel an den Zellkernen könnte das sehr klebrige pp65 sein. Doch mit jedem weiteren Aufreinigungsschritt steigt die Wahrscheinlichkeit der Läsion der Kerne und damit die Gefahr des Verlustes von intranukleär lokalisiertem pp65.

Die so aufgereinigten Zellfraktionen wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Es folgten nun die biochemischen Analysen der Fraktionen durch Western- Blots, auf deren mögliche Verunreinigung, durch eventuelle zytoplasmatische Bestandteile bzw. Kernmaterial.

4.1.3 Biochemische Analyse der Zellfraktionierung

Die nach Durchführung der Zellfraktionierung nach modifiziertem Protokoll (s. Abschnitt 3.4) erhaltenen Proben wurden zunächst zur Entfernung der hohen Salzkonzentration und der Detergenzien einer TCA- Fällung unterzogen (s. Kap. 3.1.5.1). Die TCA- Endkonzentration in der einzelnen Probe betrug zwischen 10-13%. Die erhaltenen Probenpellets wurden in NaOH aufgenommen und unter Beachtung der eingesetzten Volumina zur TCA- Fällung als auch zur Proteinbestimmung, die Proteinkonzentration berechnet.

- 1) Probenvolumen zur TCA- Fällung: 15 μl
- Um eine Endkonzentration von 10-13% TCA zu erhalten:
 15 μl TCA + 120 μl H₂O + 15 μl Probenvolumen
- 3) Probenpelletaufnahme nach der TCA- Fällung in NaOH von 65 µl
- 4) Aus 65 µl Probenvolumen wurden zur Proteinbestimmung 25 µl eingesetzt
- 5) Bei erhaltener computergestützter Berechnung der Proteinkonzentration von 0,22 μg Protein/μl ist dieser Wert mit 25 zu multiplizieren, da nur 25 μl eingesetzt wurden, berücksichtigt werden muß auch, dass die 25 μl aus einem Gesamtvolumen von 65μl stammen (siehe3)) und das in die TCA- Fällung nur 15 μl Probenvolumen eingegangen sind
- 6) Berechnung endgültiger Proteinkonzentration:

$$\frac{0,22\mu g/\mu l}{\frac{15\mu l}{65\mu l}} = 0,95\mu g \text{ Protein/}\mu l$$

Nach Berechnung der Proteinkonzentration, analog zu o. g. Beispiel, der Fraktionen Homogenat, PNS und Kern wurde zur Ankonzentrierung des Proteins eine Wessel-Fällung durchgeführt (s. Kap. 3.1.2). Von jeder Probe wurden hierbei je 50 µg Protein gefällt. Die erhaltenen Pellets wurden luftgetrocknet, dann in 1x

reduzierendem Laemmli- Puffer aufgenommen und für 3 min. bei 95°C aufgekocht. Ein 12,5% SDS- Polyacrylamidgel wurde mit den Proben beladen und es erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben (s. Kap. 3.1.1). Als Negativkontrolle wurde jeweils das Homogenat nicht HCMV- infizierter humaner Fibroblasten mitgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben im SDS-Polyacrylamidgel, schloß sich die Western- Blot- Analyse an (s. Kap. 3.1.4).

Durch Immunreaktion mit einem Lamin B Antiserum aus der Maus und gegen Maus IgG gerichteten HRP- gekoppelten Zweitantikörper ließ sich Lamin B als Markerprotein der Kernfraktion detektieren.

Nach der Immunfärbung sind auf dem Blot im Bereich von etwa 67 kDa deutliche Banden im HCMV- infizierten Homogenat und in der Kernfraktion HCMV-infizierter HFF-Zellen zu erkennen. Die HCMV-infizierte PNS- Fraktion zeigt keine Bande, so daß von einer relativ reinen PNS-Fraktion ausgegangen werden kann (s. Abb.: 4.17).

Zur Kontrolle des Vorliegens einer relativ reinen Kernfraktion wurde im Western-Blot das zytoplasmatische Enzym LDH detektiert. Als Erstantikörper diente ein LDH- Antiserum von der Ziege, der Zweitantikörper war gegen Ziegen IgG gerichtet und HRP- gekoppelt. In dieser Immunfärbung sind Banden im Bereich von etwa 30 kDa in der PNS- und Homogenat Fraktionen infizierter HFF-Zellen, sowie in der Negativkontrolle Homogenat nicht infizierter HFF-Zellen zu identifizieren. Die Bande bei etwa 40 kDa im Bereich der Kernfraktion läßt auf eine Kreuzreaktivität schließen (s. Abb.: 4.18).

Die Ergebnisse aus morphologischen- und biochemischen Untersuchungen zeigen Zellfraktionen mit ausreichender Reinheit.

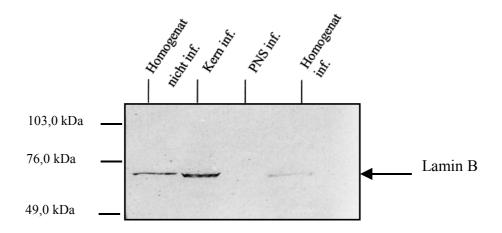


Abb. 4.17 Western- Blot- Analyse von infizierten humanen Fibroblasten, 72 Stunden nach Infektion, in den Fraktionen: Homogenat, postnukleärer Überstand (PNS) und Zellkerne. Zur Kontrolle wurde Homogenat nicht infizierter humaner Fibroblasten mitgeführt. Pro Fraktion wurden 50µg Protein aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe in der SDS- PAGE, in einem 10% Gel (s. 3.1.1) erfolgte das Blotten der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (3.1.4). Zur Kontrolle der Reinheit einer Kernfraktion wurde der Blot mit dem Antiserum gegen Lamin B inkubiert. In Höhe von ca. 67kDa ist in den Fraktionen Kerne und Homogenat infizierter humanen Fibroblasten eine deutliche Bande erkennbar, ebenso in der mitgeführten Negativkontrolle Homogenat nicht infizierter humanen Fibroblasten.

Antikörper: α- Lamin B (1:40); α-Maus- HRP- gekoppelt (1:1000)

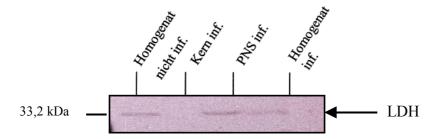


Abb. 4.18 Western- Blot- Analyse von infizierten humanen Fibroblasten, 72 Stunden nach Infektion, in den Fraktionen: Homogenat, postnukleärer Überstand (PNS) und Zellkerne. Zur Kontrolle wurde Homogenat nicht infizierter humaner Fibroblasten mitgeführt. Pro Fraktion wurden 50µg Protein aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe in der SDS- PAGE, in einem 10% Gel (s. 3.1.1) erfolgte das Blotten der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (3.1.4). Zur Kontrolle des Vorliegens einer reinen PNS- Fraktion wurde der Blot mit dem Antiserum gegen LDH inkubiert. In Höhe von ca. 30kDa ist in den Fraktionen PNS und Homogenat infizierter humanen Fibroblasten eine deutliche Bande erkennbar, ebenso in der mitgeführten Negativkontrolle Homogenat nicht infizierter humanen Fibroblasten.

Antikörper: α- LDH (1:500); α-Ziege- HRP- gekoppelt (1:2000)

4.1.4 Immunologischer Nachweis des Tegumentproteins pp65 in HCMV-infizierten HFF-Zellen

Neben den biochemisch geführten Nachweisen reiner Kern- und PNS- Fraktionen wurde mit dieser Methode auch das Phosphoprotein pp65 detektiert.

Als Negativkontrolle wurde Homogenat nicht HCMV- infizierter HFF-Zellen mitgeführt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte im 10% SDS-Polyacrylamidgel. Als ausreichende Proteinmenge erwiesen sich 16 µg Protein pro Fraktion.

Nach Abschluß des Proteintransfers auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Immunfärbung. Als Erstantikörper gegen das pp65 diente BGE-1 aus Kaninchen Antiserum, der Zweitantikörper gegen Kaninchen IgG war HRP- gekoppelt.

Die Immunreaktion zeigt deutliche Banden im Bereich von etwa 65 kDa in allen HCMV- infizierten Fraktionen. Die Negativkontrolle weist in diesem Bereich keine Immunfärbung auf.

Die obere durchgehende Bande bei etwa 76kDa läßt auf eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit anderen zellulären Bestandteilen in HFF-Zellen schließen, da diese Bande sowohl in infizierten als auch nicht infizierten HFF-Zellen nachzuweisen ist (s. Abb. 4.19).

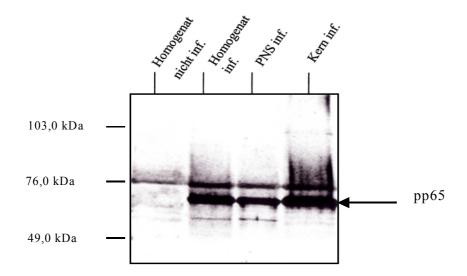


Abb. 4.19: Western- Blot Analyse zur Kontrolle des Vorliegens von pp65 in 72 Stunden infizierten HFF-Zellen. In der SDS- PAGE, in einem 10% Gel (s. 3.1.1) wurden die Fraktionen: Homogenat, postnukleärer Überstand (PNS) und Zellkerne infizierter humanar Fibroblasten sowie als Negativkontrolle das Homogenat nicht infizierter humaner Fibroblasten aufgetragen. Pro Fraktion wurden 16μg Protein eingesetzt. Hiernach erfolgte das Blotten der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (3.1.4). Diese wurde mit dem Antiserum BGE-1 gegen pp65 inkubiert. Es zeigen sich deutliche Banden in der Höhe von 65kDa in den Fraktionen infizierter HFF-Zellen. Antikörper: BGE-1 (1:100); α-Kaninchen- HRP- gekoppelt (1:1000)

Vor Einsatz des polyklonalen Antiserums BGE-1 in allen weiteren Versuchen wurde ein Vergleich mit einem monoklonalen Antikörper aus den Hybridomen 65-8, 65-14 und 65-33 (zur Verfügung gestellt durch Prof. Plachter, Mainz) durchgeführt (Abb.: 4.20).

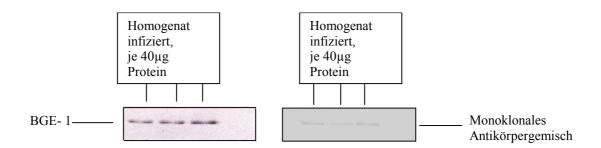


Abb.: 4.20: Vergleich der Immunreaktionen von BGE-1 und monoklonalem Antikörpergemisch im Immunoblot. Zur Untersuchung wurden je drei Fraktionen Homogenat HCMV infizierter humaner Fibroblasten und eine Negativkontrolle Homogenat nicht infizierter humaner Fibroblasten geführt. Pro Fraktion wurde jeweils 40µg Protein eingesetzt. Nach der SDS- PAGE mit einem 10% Gel erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran. Eine wurde mit dem polyklonalem Antiserum von BGE-1 inkubiert und die andere mit dem Antiserum aus dem monoklonalem Antikörpergemisch. Es zeigen sich deutlichere Banden im durchgeführtem Western- Blot mit BGE-1.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das polyklonale Antiserum BGE-1 zur Detektion des pp65 auch in weiteren Versuchen eingesetzt.

4.2 Untersuchungen zur Kinetik des pp65 in pulse- chase Experimenten

Für die Versuche wurden die HFF-Zellen mit einer TCID₅₀ von 0,0125/Zelle infiziert (s. Kap. 3.3.4). Es erfolgte eine 72 stündige Inkubation im CO₂ begasten Brutschrank bei 37°C. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurde der Zellmonolayer lichtmikroskopisch kontrolliert. Die infizierten Zellen wiesen zytopathische Veränderungen auf. Der Zellmonolayer war nicht konfluent, da es bereits zum Ablösen einzelner infizierter Zellen kam.

4.2.1 Standardisierung der Versuchsbedingungen

4.2.1.1 Verschiedene Puffer zur Immunpräzipitation

Zur Lösung dieser Frage wurde Homogenat 72 Stunden infizierter humaner Fibroblasten nach einem 30 minütigem pulse in RIPA- und TNN- Puffer immunpräzipitiert. Für die Immunpräzipitation des pp65 konnte hierfür kein wesentlicher Unterschied erkannt werden.

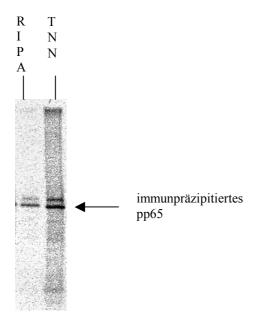


Abb.: 4.20 Vergleich der Immunpräzipitation von pp65 in RIPA- versus TNN- Puffer. Das Homogenat 72 Stunden infizierter humaner Fibroblasten, nach einem 30 minütigem pulse, wurde einmal in RIPA- und einmal in TNN- Puffer mit dem BGE-1 Antiserum immunpräzipitiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der 10%igen SDS- PAGE, pro Homogenatfraktion wurden 1x10⁶ cpm eingesetzt. Die Bande im oberen Bereich bei etwa 72kDa lässt auf eine Kreuzreaktivität schließen (s. 4.1.3).

Die weiteren Immunpräzipitationen erfolgten unter dem Einsatz des RIPA- Puffers, da kein wesentlicher Unterschied in der Stärke des Signals des immunpräzipitierten pp65 zu erkennen war.

4.2.1.2 Der optimale Temperaturausgleich in Gewebekulturflaschen

Da Transportprozesse zwischen Kompartimenten sehr schnell ablaufen, ist es für pulse- chase Versuche wichtig, daß die radioaktive Markierung von

neusynthetisierten Proteinen für wenige Minuten und möglichst scharf begrenzt erfolgt.

In Versuchen wurde festgestellt, daß der Temperaturausgleich der auf 4°C gekühlten Gewebekulturflaschen auf die für den Zellstoffwechsel optimale Temperatur von 37°C am schnellsten im 37°C vorgewärmten Wasserbad zu erreichen ist und nicht im CO₂ begasten Brutschrank bei 37°C (Abb.: 4.21).

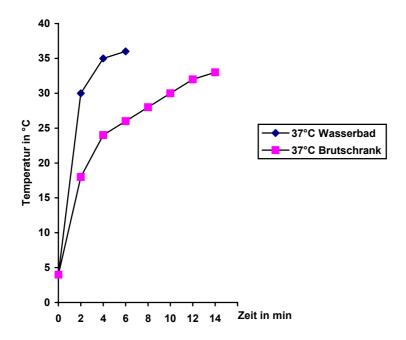


Abb.: 4.21: Abhängigkeit des Temperaturausgleiches in Gewebekulturflaschen von den Umgebungsbedingungen: Wasserbad versus Brutschrank. Die Abszisse zeigt die Zeit in Minuten an, auf der Ordinate ist die Temperatur in °C dargestellt. Die auf 4°C gekühlten Gewebekulturflaschen wurden zum einen in ein 37°C vorgewärmtes Wasserbad gestellt, zum anderen in den 37°C warmen Brutschrank. Die mit Rhomben markierte Kurve verdeutlicht, dass in 6 Minuten der Temperaturausgleich auf 37°C im Wasserbad erzielt wurde. Während die durch Quadrate gekennzeichnete Kurve den deutlich langsameren Temperaturausgleich, von über 14 Minuten, im Brutschrank veranschaulicht.

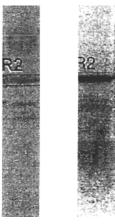
Die Grafik zeigt eindeutig einen schnelleren Temperaturausgleich bei der in das Wasserbad überführten Gewebekulturflasche. Hier wird eine Temperatur von 36°C im Flascheninneren bereits nach 6 Minuten erreicht, wohingegen dies bei der im Brutschrank deponierten Kulturflasche erst nach mehr als 14 Minuten der Fall ist.

Aufgrund dieses Experimentes wurden die Kulturflaschen während des Pulses und Chases in das Wasserbad überführt und die im Brutschrank ursprünglich gewählte Pulse- Zeit von 15 min, konnte auf 7 min, verkürzt werden.

Entsprechend den Ausführungen in Kap. 3.5.1, wurden die HCMV- infizierten HFF-Zellkulturen metabolisch mit ³⁵S-Methionin/Cystein für 7 min. markiert (Pulse) und anschließend mit nicht radioaktiven Methionin und Cystein inkubiert (Chase). Diese Chase-Zeiten betrugen bis zu 1 Stunde. Die anschließende Zellfraktionierung wurde nach dem modifiziertem Protokoll (s. Kap. 3.4) durchgeführt.

4.2.1.3 Wieviel Radioaktivität ist für die Pulse- Markierung nötig

In der Immunpräzipitation der Fraktionen Homogenat, PNS und Kern kam es zu einer quantitativ geringer ausgeprägten Bande des immunpräzipitierten pp65 in der Fraktion PNS. In verschiedenen Experimenten zeigte sich als optimale Radioaktivität für die Immunpräzipitation des pp65 in der PNS-Fraktion der Einsatz von 250000cpm, um ein ausreichendes Signal zu erhalten (Abb. 4.22).



PNS- Fraktion mit immunpräzipitiertem pp65

100000cpm 290000cpm

Abb. 4.22:Imunnpräzipitation von pp65 72 Stunden infizierter humaner Fibroblasten. Diese wurden nach einem 30 minütigem pulse in die Fraktionen postnukleärer Überstand (PNS) und Kern aufgetrennt. Hier gezeigt ist die PNS- Fraktion. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem polyklonalem BGE- 1 Antiserum. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel verwand. Es wurden zum einem 100000cpm und zum anderen 290000cpm pro Spur aufgetragen. Zu erkennen ist der qualitative Unterschied in der Immunpräzipitation von pp65 in der PNS- Fraktion in Abhängigkeit von der aufgetragenen Radioaktivität (cpm).

Oftmals konnte dem aufgrund mangelnder Materialmenge nicht nachgekommen werden, so daß hier weniger Radioaktivität bzw. Protein aufgetragen werden mußte.

4.2.2 Immunpräzipitation von pp65

Nach Berechnung der entsprechenden Proteinmenge der PNS- Fraktion, die sich an dem Zielwert 250000cpm der PNS- Fraktion in die Immunpräzipitation einzusetzen orientierte (4.2.1.3.), wurde von allen Fraktionen die gleiche Proteinmenge zur Immunpräzipitation verwendet. Entsprechend der Erläuterungen zur Durchführung der Immunpräzipitation in Kap. 3.5.4 wurden die immunpräzipitierten Proben elektrophoretisch in einem 10%, 1,5mm dicken SDS- Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Negativkontrollen wurden stets nicht infizierte HFF-Zellen, entsprechend der bereits aufgezeigten pulse- chase- Methodik, behandelt. In den SDS-Polyacrylamidgelen wurde zu jeder Chase- Zeit eine Homogenatprobe nicht infizierter Zellen mitgeführt.

Nach abgeschlossener Elektrophorese und Fixierung der Proteine im Gel (siehe Abschnitt 3.5.4) wurden die Gele für mindestens 3 Tage auf der Imaging Platte exponiert (Imaging Plate, Fujifilm, Japan). Diese Platte und die SDS-Polyacrylamidgele befanden sich hierfür in einer speziellen, verschließbaren Kassette (BAS- Cassette, Fujix, Japan).

Die Auswertung der Imaging Platte erfolgte am Phosphoimager mit anschließender computergestützter Quantifizierung der Radioaktivität der einzelnen Proteinbanden (siehe Abb: 4.23 bis 4.25). Für die Bestimmung der Bandenintensität wird ein Rechteck um die zu bestimmende Bande definiert. Die Einheit der Intensität ist die PSL (phosphostimulated luminescence). Ein Rechteck gleicher Größe wird zur Bestimmung der Hintergrundintensität in der Spur Homogenat nicht infizierter Fibroblasten eingezeichnet. Diese Hintergrundintensität (Bkg) wird von der gemessenen Bandenintensität des immunpräzipitierten pp65 der unterschiedlichen Fraktionen subtrahiert (PSL-Bkg). Die folgenden Abbildungen (Abb.: 4.23 bis 4.27) zeigen immunpräzipitiertes pp65 in den Fraktionen Homogenat (Homo), perinukleärer Überstand (PNS) und Kern zu unterschiedlichen Chase- Zeiten. Die Markierungszeit (Pulse) betrug jeweils 7 Minuten.

			R10	R1 R2	R3 R4	R5 R6	R7 R8	R9	
Nr	Gгр	Name	Тур	Fläche [mm²]	Pos[mm]	PSL	PSL/mm²	PSL-Bkg	(PSL-Bkg)/mm²
1	0	Homo 0'		14.40	(18.4/45.8)	1251.67	86.92	875.48	60.80
2	0	PNS 0'		14.40	(28/45.4)	2997.04	208.13	2620.85	182.00
3	0	Kern 0'		14.40	(35.6/45.8)	1127.74	78.32	751.55	52.19
4	0	Homo 30'		14.40	(43.6/45.8)	2494.10	173.20	2117.91	147.08
5	0	PNS 30'		14.40	(52/45.8)	3471.27	241.06	3095.08	214.94
6	0	Kern 30'		14.40	(60.4/45.8)	1807.06	125.49	1430.87	99.37
7	0	Homo 60'		14.40	(68/45.8)	2310.45	160.45	1934.26	134.32
8	0	PNS 60'		14.40	(76/45.8)	3480.83	241.72	3104.64	215.60
9	0	Kern 60'		14.40	(86/47)	3393.14	235.63	3016.95	209.51
10	0	od .	Bkg	14.40	(6/35.2)	376.19	26.12	0.00	0.00
-	0		Sum	129.60		22333.30	172.32	18947.63	146.20
-	0	-	Ges	5559.68	-	293946.78	52.87	148705.55	26.75

Abb. 4.23: Darstellung des immunpräzipitierten pp65 in den Fraktionen Homogenat (Homo), perinukleärer Überstand (PNS) und Kern in HCMV-infizierten humanen Fibroblasten zu den Zeitpunkten "end of pulse" (0'), nach 30 minütiger (30') und 60 minütiger (60') Chase-Zeit. Die im Gel mit R1 bis R10 markierten Felder dienen der Berechnung der Radioaktivität, wobei von allen als Hintergrundintensität der Background (Bkg) der korrespondierenden Fläche aus der Fraktion nicht infizierter humaner Fibroblasten (R10) subtrahiert wird. Die jeweils markierte Flächengröße (R1 bis R10) ist in allen Fraktionen identisch und beträgt hier 14,40 mm². Zur weiteren Berechnung der vorhandenen Aktivität an immunpräzipitierten pp65 wird die Bandenintensität nach subtrahierter Hintergrunintensität aus der jeweiligen Fraktion verwendet, dies entspricht den Werten aus der Tabellenspalte: "(PSL-Bkg)". Hierdurch ist die absolute Aktivität an pp65 in der entsprechenden Fraktion bestimmbar. Die Felder R1 bis R10 bezeichnen gleichzeitig die betreffende Fraktion (siehe Datenblatt mit Markierungsnummer –und Name von 1 bis 10).

Auffällig im oben wiedergegeben Datenblatt ist die geringere Bandenintensität des immunpräzipitiertem pp65 im jeweiligem Homogenat. Erwarten würde man deutliche höhere Werte im Homogenat, im Idealfall den Summenwert aus der Bandenintensität der PNS- und Kernfraktion.

R1 R2	R3 R4 R5 D6 D7	
	NO NA NO KO KI	R8

Nr	Grp	Name	Тур	Fläche [mm²]	Pos[mm]	PSL	PSL/mm²	PSL-Bkg	(PSL-Bkg)/mm²
-	0		Sum	0.00	-	0.00	0.00	0.00	0.00
-	0		Ges	6013.44		290386.95	48.29	290386.95	48.29
1	1	Homo 0'		19.20	(22/38.2)	1600.14	83.34	1209.26	62.98
2	1	PNS 0'		19.20	(31.6/37.8)	2082.17	108.45	1691.29	88.09
3	1	Kern 0'		19.20	(41.2/37.4)	581.94	30.31	191.06	9.95
4	1	Homo n. inf. 0'	Bkg	19.20	(49.2/37.4)	390.88	20.36	0.00	0.00
-	1		Sum	57.60	-	4264.25	74.03	3091.61	53.67
5	2	Homo 30'		19.20	(58.4/37.4)	2084.88	108.59	1682.30	87.62
6	2	PNS 30'		19.20	(66.8/37)	1379.75	71.86	977.17	50.89
7	2	Kern 30'		19.20	(75.2/36.6)	874.13	45.53	471.55	24.56
8	2	Homo n. inf. 30'	Bkg	19.20	(85.6/36.2)	402.58	20.97	0.00	0.00
-	2		Sum	57.60		4338.76	75.33	3131.03	54.36

Abb. 4.24: Darstellung des immunpräzipitierten pp65 in den Fraktionen Homogenat (Homo), perinukleärer Überstand (PNS) und Kernfraktion 72 Stunden HCMV- infizierter humaner Fibroblasten zu den Zeitpunkten "end of pulse" (0') und nach 30 minütiger (30') Chase-Zeit. Die im Gel mit R1 bis R8 markierten Felder dienen auch hier der Berechnung der Bandenintensität. Zur Bestimmung der Hintergrundintensität erfolgte die Einzeichnung der Felder R4 und R8, jeweils in der mitgeführten Homogenatfraktion nicht infizierter humaner Fibroblasten. Die dort bestimmte Intensität wurde als Background (Bkg) von der zu bestimmenden Bandenintensität des immunpräzipitierten pp65 der infizierten Fraktionen subtrahiert. Die jeweils markierte Flächengröße R1 bis R8 ist identisch. Zur weiteren Berechnung der absoluten Aktivität des pp65 in den verschieden Fraktionen wurden die Bandenintensitäten aus der Tabellenspalte: "(PSL-Bkg)" eingesetzt. Ebenfalls auffällig ist auch bei diesem Versuch die ermittelte Bandenintensität in PSL der Homogenatfraktinen "end of pulse" (0') und nach 30 minütiger (30') Chase-Zeit. Das Datenblatt zeigt eine deutlich geringere Bandenintensität des immunpräzipitierten pp65 im jeweiligem Homogenat, als zu erwarten wäre.

Nr	Grp	Name	Тур	Fläche [mm²]	Pos[mm]	PSL	PSL/mm²	PSL-Bkg
-	0		Sum	0.00		0.00	0.00	0.00
-	0		Ges	4898.56		164096.10	33.50	164096.10
1	1	Homo 60'		23.52	(23.6/38.8)	2053.57	87.31	1545.75
2	1	PNS 60'		23.52	(31.8/38.6)	2420.18	102.90	1912.36
3	1	Kern 60'		23.52	(40.2/38.8)	1533.59	65.20	1025.77
4	1	Homo n. inf. 60'	Bkg	23.52	(48.2/39.2)	507.82	21.59	0.00
_	1		Sum	70.56		6007.34	85.14	4483.88

R1 R2 R3 R4

Abb. 4.25: Darstellung des immunpräzipitierten pp65 in den Fraktionen Homogenat (Homo), perinukleärer Überstand (PNS) und Kernfraktion 72 Stunden HCMV-infizierter humaner Fibroblasten zu den Zeitpunkten "end of pulse" (0') und nach 60 minütiger (60') Chase-Zeit. Die im Gel mit R1 bis R4 markierten Felder zur Ermittelung der Bandenintensität in PSL sind in ihrer Größe identisch (je 23,52mm²). Das mit R4 bezeichnete Feld liegt in der mitgeführten Kontrolle HCMV nicht infizierter humaner Fibroblasten und wurde computergestützt von den zu berechnenden Bandenintensitäten der Felder R1 bis R3 subtrahiert. Diese Werte sind in der Tabellenspalte "(PSL-Bkg)" aufgezeigt und werden zur weiteren Berechnung der vorhandenen Aktivität an immunpräzipitiertem pp65 in der jeweiligen Fraktion zu den unterschiedlichen Chase- Zeiten eingesetzt.

Auch hier liegt die bereits in den Abb. 4.23 und 4.24 auffallende widersprüchliche niedrige Bandenintensität des immunpräzipitierten pp65 in der Homogenatfraktion ,im Vergleich zur Intensität der Fraktionen Kern und PNS, vor.

Nr	Grp	Name	Тур	Fläche [mm²]	Pos[mm]	PSL	PSL/mm²	PSL-Bkg	(PSL-Bkg)/mm
1	0	Homo 0'		18.00	(26/48.6)	1543.60	85.76	1077.09	59.84
2	0	PNS 0'		18.00	(35/49.6)	1783.19	99.07	1316.68	73.15
3	0	Kern 0'		18.00	(43.4/50)	1734.41	96.36	1267.90	70.44
4	0	Homo 15'		18.00	(51.6/50.8)	1650.97	91.72	1184.46	65.80
5	0	PNS 15'		18.00	(59.6/51.6)	1589.03	88.28	1122.52	62.36
6	0	Kern 15'		18.00	(68.6/52.4)	1908.76	106.04	1442.25	80.13
7	0		Bkg	18.00	(12.6/41.4)	466.51	25.92	0.00	0.00
-	0		Sum	108.00		10209.97	94.54	7410.90	68.62
-	0		Ges	5258.88	-	245676.94	46.72	109381.05	20.80

Abb. 4.26: In diesem Gel erfolgte die Immunpräzipitation von pp65 in den Fraktionen Homogenat (Homo), perinukleärer Überstand (PNS) und Kernfraktion 72 Stunden HCMV- infizierter humaner Fibroblasten zu den Zeitpunkten "end of pulse" (0') und nach 15 minütiger (15') Chase-Zeit. Zur Bestimmung der Bandenintensität des immunpräzipitierten pp65 in den Fraktion erfolgte die Eingrenzung der jeweiligen Bande mit einem Rechteck. Die Hintergrundintensität wurde hiervon

subtrahiert. Das dafür definierte Rechteck wurde in die Spur Homogenat nicht infizierter Fibroblasten gelegt (R7). Jedes dieser Rechtecke (R1 bis R7) hat die gleiche Größe (18,00mm²). Zur weiteren Berechnung der vorhandenen Aktivität an immunpräzipitierten pp65 in den verschiedenen Fraktionen wurden die Daten aus der Tabellenspalte "(PSL-Bkg)" eingesetzt. Bei der Betrachtung der Werte aus dieser Spalte ist wiederum auffällig, dass die Bandintensitäten der Homogenatfraktion deutlich unter den Werten der Fraktionen perinukleärer Überstand (PNS) sowie der Kernfraktion aus gleichem Versuchsansatz liegen.

٧r	Grp	Name	Тур	Fläche [mm²]	Pos[mm]	PSL	PSL/mm²	PSL-Bkg
1	0	Homo 30'		24.00	(61.8/48.8)	2331.68	97.15	1722.39
2	0	PNS 30'		24.00	(70.6/49.2)	1823.12	75.96	1213.83
3	0	Kern 30'		28.00	(80.6/49.8)	1877.33	67.05	1166.49
4	0		Bkg	28.00	(45/42.6)	710.84	25.39	0.00
_	0		Sum	76.00	_	6032.14	79.37	4102.72
-	0		Ges	6645.76	-	243125.95	36.58	74409.35

Abb. 4.27: Das Gel zeigt die Immunpräzipitation von pp65 in den Fraktionen Homogenat (Homo), perinukleärer Überstand (PNS) und Kernfraktion 72 Stunden HCMV- infizierter humaner Fibroblasten nach 30 minütigem (30') Chase. Zur Bestimmung der Bandenintensität des immunpräzipitierten pp65 in den Fraktion erfolgte die Eingrenzung der jeweiligen Bande mit einem Rechteck. Die Hintergrundintensität wurde hiervon subtrahiert. Das dafür definierte Rechteck wurde in die Spur Homogenat nicht infizierter Fibroblasten gelegt (R4). Jedes dieser Rechtecke (R1 bis R4) hat die gleiche Größe (24,00mm²). Die Daten aus der Tabellenspalte "(PSL-Bkg)" wurden auch hier zur weiteren Berechnung der vorhandenen Aktivität an immunpräzipitierten pp65 herangezogen. Dieser Versuch war der Einzige, in dem der Wert der Bandintensität der Homogenatfraktion nicht deutlich niedriger als der, der Fraktion perinukleärer Überstand (PNS) und Kernfraktion war. Aber eine Annäherung an die Summe der Werte der Bandenintensität aus PNS- und Kernfraktion liegt auch hier nicht vor.

Die in den Datenblätter (Abb. 4.23 bis 4.27) aufgeführten Werte sind absolute Werte und beziehen sich nur auf das eingesetzte Probenvolumen. Sie ermöglichen so keinen Vergleich der einzelnen Versuche miteinander. Daher wurde die computergestützt berechnete Intensität pro Bande des immunpräzipitierten pp65 auf das Gesamtvolumen der jeweiligen eingesetzten Fraktion bezogen. Die folgenden Tabellen (Tab. 4.1 bis 4.3) fassen die Berechnungen der Gesamtintensitäten pro Fraktion zusammen.

Chase-Zeit in min	Berechnete Gesamtintensität in PSL an pp65/Fraktion (s. Abb.:						
	4.23)						
	Homogenat	PNS	Kern				
0	21012	42982	1879				
30	88952	59426	3577				
60	88976	67060	6637				

Tab. 4.1: Aufgezeigt ist die berechnete Gesamtintensität an pp65 in den verschiedenen Fraktionen Homogenat, PNS und Kern zu den Chase- Zeiten 0- 30- und 60 Minuten. Hierfür wurden die Werte aus dem Datenblatt Abb.: 4.23 der Spalte "(PSL-Bkg)" auf das Gesamtvolumen der Fraktionen bezogen. Dieses betrug: für das Homogenat: 3500μl, für den PNS 4000μl und für die Kernfraktion 250μl je Versuch. In Abhängigkeit des eingesetzten Probenvolumens wurde die oben aufgeführte Gesamtintensität errechnet.

Beispiel: Gesamtvolumen an Homogenat des Versuches mit der Chase- Zeit von 0 Minuten: 3500μ l. Das für die Immunpräzipitation eingesetzte Probenvolumen betrug: 125μ l. Daraus errechnet sich für das Homogenat mit der Chase- Zeit von 0 Minuten eine Gesamtintensität von 21012 PSL = 875,48 PSL-Bkg x145 (s. Abb. 4.23). Die weiteren Werte berechneten sich analog zum aufgezeigten Beispiel.

Chase-Zeit in min	Gesamtintensität in PSL an pp65/Fraktion (s. Abb.: 4.24 und						
	4.25)						
	Homogenat	PNS	Kern				
0	26598	32805	290				
30	37004	17248	1000				
60	30143	34578	1406				

Tab. 4.2: Aufgezeigt ist die berechnete Gesamtintensität an pp65 in den verschiedenen Fraktionen Homogenat, PNS und Kern zu den Chase- Zeiten 0- 30- und 60 Minuten. Zur Berechnung dienten die Daten "PSL-Bkg" des Datenblattes der Abb. 4.24 und 4.25. Das Gesamtvolumen pro Fraktion der 3 aufgezeigten Versuche betrug für das Homogenat je 3500μl, für die PNS- Fraktion je 4200μl und je 250μl pro Kernfraktion. Beispielberechnung siehe Tabelle 4.1.

Chase-Zeit in min	Gesamtaktivität in PSL an pp65/Fraktion (s. Abb.: 4.26 und						
	4.27)						
	Homogenat	PNS	Kern				
0	21757	17907	1268				
15	18833	15266	1731				
30	40132	9468	1166				

Tab. 4.3: Aufgezeigt ist die berechnete Gesamtintensität an pp65 in den verschiedenen Fraktionen Homogenat, PNS und Kern zu den Chase- Zeiten 0- 15- und 30 Minuten. Zur Berechnung dienten die in den Datenblättern der Spalte "PSL-Bkg" aufgeführten Werte der Abb. 4.26 und 4.27. Die Gesamtvolumina der Fraktionen betrug pro Versuch je 3500µl Homogenat, je 4000µl PNS und je 250µl Kern. Beispielberechnung siehe Tabelle 4.1.

Die in den Tabellen 4.1 bis 4.3 berechneten Gesamtintensitäten je Fraktion zu den unterschiedlichen Chase- Zeiten erlauben weiterhin noch keinen Vergleich der einzelnen Versuche miteinander. Hierzu ist es notwendig, den relativen Anteil an pp65 zu berechnen. Zur Berechnung des relativen Anteils an pp65 in der Kernfraktion wurde die ermittelte Gesamtintensität an pp65 der Kernfraktion zum Zeitpunkt "end of pulse" (entspricht der Chase-Zeit von 0 Minuten) mit 1 gleichgesetzt. Der relative Kernanteil ergab sich dann aus dem Verhältnis absoluter Kernanteil nach Chase-Zeit x zu absolutem Kernanteil zum Zeitpunkt "end of pulse".

Beispiel zur Berechnung des relativen Kernanteiles an pp65 nach einer Chase-Zeit von 30 Minuten zum Versuch siehe Abb.:4.23 und Tabelle 4.1.: Die Summe der Gesamtintensitäten von PNS und Kern am Ende des Pulse beträgt 44861 mit einem Kernanteil von 1879=4,4%.

Bei dem Versuch mit der Chase-Zeit von 30 Minuten ist die Summe der Gesamtaktivitäten aus PNS und Kern mit 63003 zu berechnen. Bei einer Aktivität des pp65 im Kern von 3577=5,7% ergibt sich der absolute Kernanteil von pp65 nach 30 Minuten Chase von 1,4.

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 4.4) fasst den relativen Kernanteil an pp65 zu den einzelnen Versuchen mit unterschiedlichen Chase- Zeiten zusammen.

Chase-Zeit in	Relativer Kernanteil an pp65						
min							
	Zu Versuch	Zu Versuch	Zu Versuch				
	s. Abb. 4.23	s. Abb. 4.24 und 4.25	s. Abb. 4.26 und 4.27				
15			1,3				
30	1,4	6,1	1,7				
60	2,1	4,4					

Tab. 4.4: Aufgezeigt ist der berechnete relative Kernanteil an pp65 zu den Chase-Zeiten: 15min. 30min und 60min. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Graphische Darstellung genutzt siehe Abschnitt 4.2.2

4.2.2.1 Graphische Darstellung des relativen Kernanteils an pp65 in Abhängigkeit von der Chase-Zeit

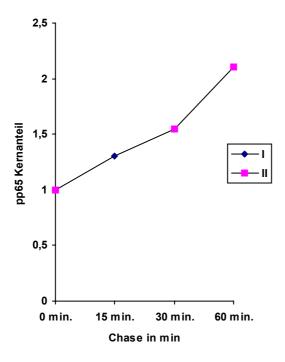


Abb. 4.26: Auf der Ordinate ist der relative Kernanteil des pp65 aufgezeigt und auf der Abszisse die Chase-Zeit in Minuten. Aufgeführt sind Experimente mit den Zellfraktionen end of pulse (0 Minuten), sowie mit einer chase- Zeit von 15, 30 und 60 Minuten. Dargestellt ist der relative Kernanteil an pp65 zu den Versuchen s. Abb.: 4.23 und 4.25.

In der Grafik sind zwei der in Tabelle 4.4 aufgezeigten Experimente (Versuche zu Abb.: 4.23 und 4.25) dargestellt. Gezeigt wird der Kernanteil an pp65 in Abhängigkeit von der Chase-Zeit, also der Zeitdauer, in der die zugeführten radioaktiv markierten Aminosäuren in Proteine eingebaut und transportiert werden. Zur grafischen Darstellung wurde für den Zeitwert 30 minütiger Chase der Mittelwert aus Exp. 4.23 und 4.25 gebildet. Die Darstellung des Versuches 4.24 ist nicht aufgezeigt worden, da diese Werte nicht zu verfizieren waren. Dieses Experiment zeigt einen außergewöhnlich hohen Anteil an pp65 nach 30 minütigem Chase. Nach 60 Minuten ist der Kernanteil an pp65 um 30% gefallen.

Die in Abb. 4.26 aufgezeigten Kurven zeigen einen Anstieg an pp65 in der Kernfraktion mit andauernder Chase- Zeit. In den Kurven I und II sind gut miteinander korrespondierende Werte des Kernanteils an pp65 festzustellen, mit Zunahme des Kernanteils an pp65 nach einer 15 minütigen Chase-Zeit.

Die Werte aus 4.24 könnten in eine mit zytoplasmatischen Bestandteilen verunreingte Kernfraktion begründet sein.

Die Ergebnisse der Pulse- Chase- Versuche zeigten, daß durch sie keine eindeutigen Rückschlüsse auf die intrazelluläre Kinetik des pp65 zu treffen sind. Eine absolut reine Kernfraktion ist durch die oben aufgeführte Zellfraktionierung nicht zu erreichen. Die Verunreinigung der Kernfraktion war bereits durch mikroskopische Analysen der Zellfraktionen bekannt. Aufgrund jeweils unterschiedlich starker, nicht abschätzbarer Kontamination der Kernfraktion sind durch diese Methodik keine verifizierbaren Experimente zur Kinetik von pp65 durchzuführen.

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung der Kinetik des Tegumentproteins pp65 ist die in vivo- Untersuchung mit einem pp65- GFP- Fusionsproteins in Transfektionsexperimenten.

4.3 Transfektionsversuche mit pp65

Da die pulse- chase- Versuche kein eindeutiges Ergebnis brachten, wurden Transfektionsversuche mit regulierbarem Promotor durchgeführt.

Die HFF-Zellen wurden in 6 cm Ø Gewebekulturschalen bis zum Erreichen der Konfluenz des Zellrasens gehalten. Die Transfektionsversuche wurden mit einem Fusionsprotein aus pp65 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) durchgeführt. Dieses Konstrukt befand sich im pcDNA3.1 Expressionsvektor (Fa. Invitrogen) unter Kontrolle des HCMV- Promotors (major- immediate early promotor- enhancer). Dieser Promotor gewährleistet eine effiziente Expression des Fusionsproteins.

Das bei der Transfektion eingeschleuste DNA- Konstrukt, bestehend aus dem Fusionsprotein pp65 und dem GFP, kann als Genprodukt leicht unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand seiner grünen Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies bedeutet, alle unter dem Fluoreszenzmikroskop grün aufleuchtenden Strukturen beinhalten das zu untersuchende Phosphoprotein pp65.

Die Transfektion erfolgte gemäß der Beschreibung in Kap. 3.6.

Nach etwa 12 Stunden wurde das Transfektionsergebnis mikroskopisch beurteilt (konfokales Laser Scanning Mikroskop, LSM 410, Fa. Zeiss). Die Kerne der Fibroblasten zeigten grün fluoreszierende granuläre Strukturen. Diese waren über den gesamten Zellkern verteilt und sparten den Nukleolus aus (siehe Abb.:4.27).

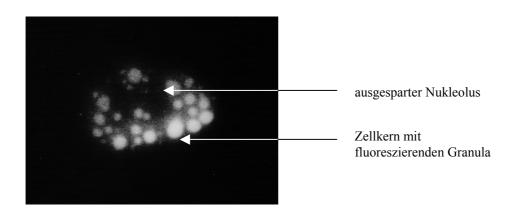


Abb. 4.27: prim. HFF, 18 h nach Transfektion mit dem pp65/GFP Fusionsprotein, mit einem konfokalem Laser Scanning Mikroskop untersucht. Im Zellkern sind die grün fluoreszierenden granulären Strukturen darstellbar, als indirekter Nachweis von pp65. Der Nukleolus selbst ist von diesen Strukturen ausgespart.

Zur Beobachtung von Veränderungen der granulären Strukturen wurden die transfizierten HFF-Zellen über 24 Stunden mikroskopisch untersucht. Es erfolgten alle 40 Minuten Aufnahmen dieser Zellen. Hierbei konnte festgestellt werden, daß die granulären Strukturen zu einzelnen größeren konfluierten. Die Fluoreszenzintensität wurde computergestützt berechnet (Programm: AIDA, Fa. Raytest). Sie zeigte eine Abnahme der Gesamtintensität über den Zellkern, trotz makroskopisch erscheinender intensitätsreicheren Granula (siehe Abb.4.28 u. 4.29).

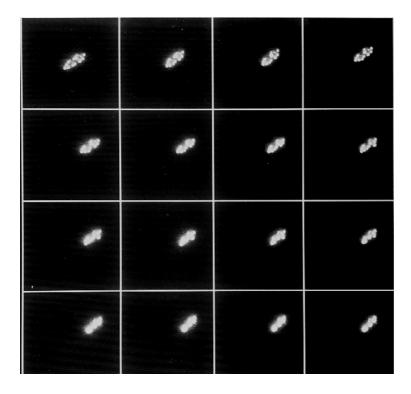


Abb. 4.28: prim. HFF-Zellen, 18 h nach Transfektion mit dem pp65/GFP Fusionsprotein, mit einem konfokalem Laser Scanning Mikroskop untersucht. In Abständen von 40 min. wurden insgesamt 16 Bilder aufgenommen. Die anfänglich kleinen granulären Strukuren konfluieren zu größeren, die sich im Verlauf von 24 Stunden nicht mehr ändern.

Obwohl die Intensität der größeren Strukturen höher erscheint, konnte computergestützt mit Hilfe des AIDA Programms eine langsame Abnahme der Gesamtintenstät des fluoreszierenden pp65/GFP Fusionsproteins im Zellkern berechnet werden (Abb.:4.29).

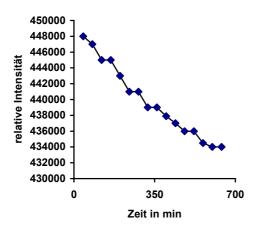


Abb. 4.29: Darstellung der Gesamtfluoreszenz der granulären Strukturen mit Abnahme der Intensität des pp65/GFP Fusionsproteins im Zellkern, in Abhängigkeit von der Zeit nach Transfektion.

Zur Untersuchung der Ausbildung der intranukleären Strukturen wurden pp65/GFP transfizierte Zellen zu einem früheren Zeitpunkt untersucht (siehe Abb.:4.29). Nach Quantifizierung der Fluoreszenzintensität in einzelnen Zellen zeigten sich um den Faktor 8 unterschiedliche Werte.

Die Ursache dieser Unterschiede müßte in weiteren Transfektionsexperimenten untersucht werden.

Weiterhin bleibt unklar, ob die Kinetik des pp65 mit diesem Versuchsansatz sinnvoll untersucht werden kann .

5 Diskussion

5.1 Das Tegumentprotein pp65

Das Phosphoprotein pp65 wird auch als das untere Matrixprotein bezeichnet. Es ist ein wesentlicher Bestandteil des Tegumentes im reifen Virion. In den DBs und in den NIEPs ist es ebenfalls nachzuweisen (Schmolke et al., 1995). Die DBs bestehen zu etwa 95% aus dem Phosphoprotein pp65. Das pp65 wird in der β- bis γ-Genexpressionsphase transkribiert, dies entspricht einem Zeitraum ab 4 Stunden nach erfolgter Infektion. Der Nachweis des pp65 im Kern infizierter Zellen gelingt aber sehr viel früher (Revello et al., 1992; Grefte et al., 1992). Verantwortlich für diesen schnellen Kerntransport sind zwei unterschiedliche nukleäre Lokalisationssequenzen (Schmolke et al., 1995; Gallina et al., 1996). Dies lässt eine wesentliche Bedeutung des pp65 während der frühen Ereignisse des viralen Infektionszyklus vermuten. Weiterhin konnten eine Proteinkinaseaktivität des pp65 (Somogyi et al., 1990), eine direkte Interaktion zwischen dem pp65 und den Laminen sowie eine Akkumulation des pp65 an der Kernmembran (Sanchez et al., 1998) festgestellt werden. Bekannt ist weiterhin, dass während einer HCMV- Infektion die Kernlamina modifiziert und fokal aufgelöst wird (Radsak et al., 1989 und 1991). Diese Veränderungen können ab 48 h p. i. nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt ordnet sich bereits das Tegument um die im Zellkern lokalisierten Nukleokapside an. Für die intranukleäre Verteilung des pp65 im Zellkern infizierter Zellen scheint die UL97 Kinase wichtig zu sein. Bei fehlender UL97- Kinaseaktivität kommt es zur unkontrollierten Ausbildung von Aggregaten im Zellkern, welche

Struktur- und Tegumentproteine beinhalten. Vor allem bestehen diese Strukturen aus pp65, ppUL25 und dem MCP (major capsid protein). Diese Strukturen sind den DBs sehr ähnlich, ob sie verwandt sind, ist unklar. Die Kinase UL97 verhindert die Bildung dieser Aggregate, so dass angenommen werden kann, dass die UL97-Kinase für die regelrechte Funktion der Tegumentproteine und der viralen Morphogenese im Zellkern bedeutend ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass in Abwesenheit von pp65 oder der UL97- Kinase das Virostatikum Maribavir wirkungslos ist (Prichard et al., 2005).

Dal Monte et al. konnten nachweisen, dass pp65 bevorzugt im Bereich kondensierten Chromatins lokalisiert ist. Untersuchungen zeigten eine spezifische Bindung zwischen pp65 und kondensiertem Chromatin. Dies war unmittelbar nach Infektion nachweisbar, als auch in der späten Phase der Replikation für das neusynthetisierte pp65. Hierdurch sind chromosomale Abberrationen mit genetischen Defekten nach einer primären intrauterinen HCMV- Infektion erklärbar. Einer Interaktion zwischen dem pp65 und der Polo- like Kinase 1 kommt hierbei eine entscheidende Bedeutung zu. In gesunden Zellen steuert die Polo- like Kinase 1 die regelrechte Ausbildung des Centrosoms und damit eine intakte mitotische Spindel (Gallina et al., 1999).

Diese Beobachtungen machen eine bedeutende Rolle des pp65 in der fokalen Veränderung der Kernhülle und damit in der Transportknospung, sowie in der Tegumentation wahrscheinlich.

Andererseits ist das pp65 nicht essentiell für die virale Maturation in Kultur. Die mit der pp65 Deletiosmutanten infizierte Zellen zeigten vergleichbare phänotypische Veränderungen wie mit dem Wildtyp infizierte Zellen. Die Replikation des HCMV erfolgte weiterhin, die virale Reifung und die zytopathischen Veränderungen liefen lediglich zeitlich mit einer Verzögerung von etwa 2- bis 3 Tagen ab (Schmolke et al., 1995).

Die wesentliche klinische Bedeutung des pp65 liegt heute hauptsächlich in der Funktion als Antigen bei der Diagnostik einer HCMV- Infektion bei Transplantationspatienten.

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Kerntransport des pp65 in der späten Replikationsphase HCMV- infizierter primärer menschlicher Fibroblasten (72 Stunden nach Infektion). Die Kinetik des pp65 könnte weitere Rückschlüsse auf mögliche Funktionen des Proteins zulassen.

Für weitere Untersuchungen mußten das pulse- chase System mit in vitro infizierten primären menschlichen Fibroblasten als auch die Zellfraktionierung standardisiert werden.

5.2 Standardisierung der Zellfraktionierung und des pulse-chase-Systems mit in vitro infizierten primären menschlichen Fibroblasten

Voraussetzung für die Untersuchungen zum intrazellulärem Transport von pp65 ist die Herstellung reiner Kern- und Zytosolfraktionen. Für das Erreichen dieses Zieles waren zahlreiche Versuche und Modifikationen des Zellfraktionierungsprotokolls nötig.

Die Fraktionen wurden zur Kontrolle lichtmikroskopisch untersucht. Nach spezieller Anfärbung der Kernfraktion mit dem Hoechst- Farbstoff konnte festgestellt werden, dass diese Fraktion zwar Zellkerne beinhaltet, diese aber teilweise geschädigt waren. Die weiteren elektronenmikroskopischen Analysen zeigten, dass durch die Zellfraktionierung keine reine Kernfraktion erreicht wurde. Denn die Zellkerne wiesen zum Teil noch zytoplasmatische Reste auf.

Eine weitere forcierte Aufreinigung der Kernfraktion würde aber mit großer Wahrscheinlichkeit die Zellkerne völlig zerstören.

In den biochemischen Analysen der Zellfraktionen schien eine ausreichende Reinheit gegeben zu sein. Denn die für das Zytosol und den Kern eingesetzten spezifischen Marker (LDH bzw. Lamin B) konnten weitgehend nur in der Zytosol- bzw. Kernfraktion nachgewiesen werden.

Damit wurde das modifizierte Zellfraktionierungsprotokoll (s. Abschnitt 3.4) ohne weitere Reinigungsschritte der Kernfraktion für alle weiteren Untersuchungen angewandt. Auch wenn die elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine mögliche Ergebnisbeeinträchtigung vermuten ließen.

Im Weiteren wurden die pulse- chase Versuche standardisiert. Zunächst wurden Versuche zur Optimierung des Temperaturausgleiches in den Gewebekulturflaschen durchgeführt. Um möglichst schnell die für den Zellstoffwechsel optimalen 37°C zu erreichen, wurden die Gewebekulturflaschen im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Um in der Immunpräzipitation eine ausreichende Signalintensität zu erlangen, war es notwendig von der PNS- Fraktion eine Proteinmenge mit mindestens 250000cpm aufzutragen. Orientierend daran wurde dann von jeder anderen Fraktion die gleiche Proteinmenge eingesetzt.

Die computergestützt berechneten radioaktiven Intensitäten für das immunpräzipitierte pp65 wurden auf das Gesamtvolumen der entsprechenden Fraktion bezogen. Für den Vergleich einzelner Versuche wurde der absolute Kernanteil an präzipitiertem pp65 berechnet.

Die pulse- chase Untersuchungen fanden an primären humanen Fibroblasten 72 h nach HCMV- Infektion statt. Für die pulse- chase Versuche wurden humane Fibroblasten der neunzehnten und zwanzigsten Passage verwendet. In humanen

Fibroblasten 72 h nach HCMV- Infektion befindet sich bereits nicht markiertes pp65 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Wie aus anderen Arbeiten bekannt ist, kann das pp65, als nicht neusynthetisiertes Protein, bereits sehr früh nach Infektion im Zellkern nachgewiesen werden (Revello et al., 1992; Grefte et al., 1992). Die Expression und damit der Nachweis von neusynthetisiertem pp65 ist ab etwa 4 h p.i. möglich. Zunächst ist das neusynthetisierte pp65 nur im Zellkern nachzuweisen, ab 24 Stunden nach erfolgter Infektion gelingt der Nachweis des pp65 im Zytoplasma infizierter HFF. Die Expression von pp65 nimmt bis 96 h p.i. zu, wobei die Lokalisation des pp65 ab 72 h p.i. im Zytoplasma ausgeprägter ist, als im Zellkern (Hensel et al., 1995; Depto & Stenberg, 1989).

Durch die pulse- chase Versuche an HFF- Zellen 72 h nach HCMV- Infektion wird die Kinetik des zu diesem Zeitpunkt neusynthetisierten pp65 untersucht.

Alle Versuche zeigten unabhängig vom Transportzeitraum eine Zunahme des pp65 in der Kernfraktion. Unterschiedlich ist die Schnelligkeit des Anstiegs von neusynthetisiertem pp65 im Kern und die intranukleäre Quantität des pp65. Zwei der Versuche zeigen miteinander korrespondierende Werte. Der sehr rasche Anstieg von pp65 in einem dritten Versuch und die Verminderung des Kernanteiles von pp65 nach einem Transportzeitraum von 60 min. konnte nicht verifiziert werden. Eine mögliche Ursache könnte eine stärkere zytoplasmatische Verunreinigung dieser Kernfraktionen sein. Auch zu bedenken gilt eine Verunreinigung durch dense bodies. Diese bestehen zu etwa 95% aus dem pp65. Bei der Verwendung von humanen Fibroblasten höherer Passage werden deutlich mehr dense bodies produziert, so dass dies der Grund einer Überexpression von pp65 in Zellkultur bei der Nutzung von humanen Fibroblasten höherer Passage sein könnte (Geballe et al., 1986; Klages et al., 1989).

Auf Grund der nicht abschätzbaren und nicht quantifizierbaren Verunreinigung der Kernfraktion ist über diesen Versuchsansatz keine eindeutige Aussage zum Kerntransport des pp65 in der späten viralen Replikationsphase HCMV- infizierter HFF möglich.

Bestätigt werden konnte in dem Versuchsansatz, wie aus Vorarbeiten bereits bekannt, dass 72 Stunden nach Infektion das pp65 vor allem im Zytoplasma lokalisiert ist.

Weiterhin wurde gezeigt, dass der Kerntransport von pp65 auch in der späten Replikationsphase erfolgt.

Durch diesen Versuchsansatz nicht zu klären ist, in welcher Menge und wie schnell der Kerntransport des pp65 stattfindet.

In der weiteren Arbeit sollte untersucht werden, ob durch Transfektionsversuche die Kinetik des pp65 in primären menschlichen Fibroblasten besser zu klären ist.

5.3 Transfektionsversuche mit pp65- ein alternativer in vivo- Versuchsansatz zur Untersuchung der Kinetik von pp65

Während der pulse- chase Versuche zeigte sich, dass der intrazelluläre Transport des pp65 nur schwierig zu untersuchen war. Durch die Transfektionsversuche sollte die Aufnahme des Phosphoproteins pp65 und dessen Kinetik im Zellkern morphologisch an lebenden Zellen dargestellt werden.

Für die Transfektionsversuche wurde ein Fusionsprotein aus pp65 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) eingesetzt. Dieses Konstrukt befand sich im pcDNA3.1 Expressionsvektor (Fa. Invitrogen) unter Kontrolle des HCMV-Promotors (major- immediate early promotor- enhancer). Die Transfektion erfolgte

an primären menschlichen Fibroblasten. Das Transfektionsergebnis wurde 12 Stunden nach Transfektion mikroskopisch über ein konfokales Laser Scanning Mikroskop beurteilt. Die Zellkerne der transfizierten Fibroblasten zeigten grün fluoresziernde granuläre Strukturen. In der zeitabhängigen Lebendmikroskopie fusionierten diese granulären Strukturen im Zeitraffer.

Die Fluoreszenzintensität wurde computergestützt berechnet (Programm: AIDA, Fa. Raytest). Die Quantifizierung der Gesamtintensität über den Zellkern nimmt mit zunehmender Dauer nach Transfektion ab.

Allerdings zeigte die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität in einzelnen Zellen um den Faktor acht unterschiedliche Werte. Dies bedeutet, dass die zunächst exemplarisch gewonnenen Werte an entsprechend großer Zellzahl und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion fortgeführt werden müssten.

Dieser Versuchsansatz läßt den Kerntransport des pp65 erkennen. Zur Beantwortung der Frage über die Kinetik des pp65 sind weitere Versuche notwendig.

5.4 Mögliche Funktionen von pp65

Wie eingangs erläutert, überwinden in der Transportknospung die viralen Vorläufer die Kernmembran und gelangen in das Zytoplasma. Die Kernporen sind durchlässig für Partikel mit einer Größe von etwa 4,5nm, virale Nukleokapside aber haben eine Größe von etwa 100nm. Untersuchungen von Radsak et al. zeigten fokale Veränderungen in der Kernmembran, die diesen Transport ermöglichen. Verantwortlich für diese fokalen Veränderungen ist die Dephosphorylierung der Lamine (Radsak et al., 1991). Zu spekulieren bleibt, ob das pp65 mit seiner

Proteinkinase Aktivität an diesem Prozeß beteiligt ist. Untersuchungen von Sanchez et al. zeigten eine Akkumulation des pp65 an der Kernmembran und sogar eine direkte Interaktion zwischen pp65 und den Laminen (Sanchez et al.,1998).

Da die dense bodies zu 95% aus dem Tegumentprotein pp65 bestehen und diese Partikel umhüllt sind, ist anzunehmen, dass alle wesentlichen Informationen für die Umhüllungsprozesse im pp65 enthalten sind.

Doch ist das pp65 nicht essentiell für die virale Maturation in Kultur, wie

Doch ist das pp65 nicht essentiell für die virale Maturation in Kultur, wie Untersuchungen mit der pp65 Deletiosmutanten gezeigt haben (Schmolke et al., 1995).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben nachgewiesen, dass ein Kerntransport von pp65 auch in der späten Phase der viralen Replikation stattfindet. Ungeklärt bleibt, in welchem Ausmaß dieser stattfindet und durch welche Transportmechanismen das 65kDa große Phosphoprotein in den Kern transportiert wird.

Zusammenfassung 101

6 Zusammenfassung

Der offene Leserahmen UL83 des humanen Cytomegalievirus kodiert für das Phosphoprotein pp65 (ppUL83). Es gehört zu den Tegumentproteinen und ist in DBs, NIEPs und infektiösen Virionen nachweisbar.

Sofort nach Infektion wird es in den Zellkern transportiert, koordiniert durch zwei nukleäre Lokalisationssequenzen, unabhängig von der viralen Genexpression. Neusynthetisiertes pp65 ist bereits 4 Stunden nach Infektion nachweisbar, bis 24 Stunden nach Infektion ist es im Kern lokalisiert. Ab 48 Stunden nach Infektion ist es im Zytoplasma detektierbar und die Quantität im Zellkern nimmt ab. 48 Stunden nach Infektion steigt die Expression an, um ein Maximum zwischen 72- bis 92 Stunden nach Infektion zu erreichen.

Eine Beteiligung des pp65 an den Transport- und Reifungsknospungsprozessen ist wahrscheinlich.

Durch pulse-chase Versuche mit in vitro infizierten primären Fibroblasten (72h p.i.) konnte ein Kerntransport des pp65 auch in der späten Phase der viralen Replikation gezeigt werden. Durch die Experimente konnte jedoch keine genaue Aussage zur Quantität des Kerntransports getroffen werden.

Mögliche Ursachen hierfür sind die Verunreinigung der Kernfraktionen durch:

- a) zytoplasmatische Reste, was sich bereits in der Elektronenmikroskopie vermuten ließ.
- b) die Zunahme von DBs bei der Verwendung von primären humanen Fibrobalsten höherer Passage.

Auf Grund dieser Tatsache wurde über einen weiteren Versuchsansatz mit Transfektionsexperimenten versucht die Aufnahme von pp65 in den Zellkern morphologisch darzustellen. Hierfür wurde ein Fusionsprotein aus pp65 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) genutzt. Dieses Konstrukt befand sich im pcDNA3.1 Expressionsvektor (Fa. Invitrogen) unter Kontrolle des HCMV- Promotors (major- immediate early promotorenhancer). Untersuchungen mit dem konfokalem Laser Scanning Mikroskop zeigten grün fluoreszierende granuläre Strukturen ab etwa 12 Stunden nach Transfektion. Beobachtungen dieser granulären Strukturen über 24 Stunden zeigten ein Konfluieren zu einzelnen größeren

Zusammenfassung 102

Granula und eine Abnahme der Gesamtintensität des fluoreszierenden Proteins über den Zellkern.

Diese Versuchsdaten wurden bisher nur exemplarisch ausgewertet. Um weitere Aussagen zur Transportkinetik des pp65 machen zu können, müßten Daten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion an möglichst vielen Zellkernen gesammelt werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb. Abbildung

AIDS aquired immunodeficiency syndrome

(erworbenes Immundefektsyndrom)

APS Ammoniumpersulfat

Bkg background (Hintergrund)

Blotto Fettfreies Magermilchpulver

Bp Basenpaare

BSA Bovine serum albumine

(Rinderserumalbumin)

Ci Curie

CID cytomegalic inclusion disease

cpm counts per minute (Impulse pro Minute)

Cys Cystein
d Tag (e)
Da Dalton

DBs dense bodies

DNA Desoxyribonucleinsäure

EBV Epstein Barr Virus

ER Endoplasmatisches Retikulum

FKS Fötales Kälberserum

g Erdbeschleunigung (9,81 m/sec)

gB Glykoprotein B

GFP grün fluoreszierendes Protein

gH Glykoprotein H

Glu Glutamin
h Stunde (n)

H₂O Destilliertes Wasser

HCMV Humanes Cytomegalievirus

HFF humane foreskin fibroblasts (menschliche

Vorhautfibroblasten)

HHV Humanes Herpesvirus

Homo Homogenat

HRP horseradish- peroxidase (Meerrettich-

Peroxidase)

HSV Herpes Simplex Virus

IE immediate early (sehr früh)

inf. infiziert
kB Kilobasen
kDa Kilodalton

LDH Laktatdehydrogenase

M molar

mA Milliampere

MEM Minimum essental medium

Met Methionin

MIEP major immediate early promotor/

enhancer

mg Milligramm
min Minute (n)
ml Milliliter
mM Millimolar

mRNA Messenger- Ribonucleinsäure

NIEP Non- infectious enveloped particle (nicht-

infektiöses umhülltes Partikel)

NP-40 Nonidet P-40

ORF offener Leserahmen

p. i. post infectionem (nach Infektion)

PAA Polyacrylamidgel

PAGE Polyacrylamid- Gelelektrophorese

PMSF Phenylmethansulfonylfluorid

PNS Perinuclear supernatend (perinukleärer

Überstand)

pp Phosphoprotein

PSL phospostimulated luminescence

(Phosphostimulierte Lumineszenz)

RES Retikulo- endotheliales System

rpm rounds per minute (Umdrehungen pro

Minute)

RT Raumtemperatur

SDS Sodiumdodecylsulfat

sec Sekunde (n)

TCA Trichloressigsäure

TCID₅₀ tissue culture infective dose 50

(Gewebekultur infektiöse Dosis 50)

TEMED Tetramethylendiamin

TGN Trans- Golgi- Netzwerk

ü. N. über Nacht

V Volt

v/v Volume per volume (Volumen pro

Volumen)

w/v weight per volume (Gewicht pro

Volumen)

ZNS Zentralnervensystem

Zyt. Zytosol

8 Literaturverzeichnis

Baldick, C. J., Jr. & Schenk, T. (1996). Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. J. Virol 70: 6097-6105.

Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Chee, M. S., Hutchinson, C. A., Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E., Satchwell, S. C., Tomlinson, P., Weston, K. M.& Barrell, B. G. (1991a). The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. DNA Seq 2: 1-12.

Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Chee, M. S., Hutchinson, C. A., Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E., Satchwell, S. C., Tomlinson, P., Weston, K. M.& Barrell, B. G. (1991b). The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. DNA Seq 2: 1-12.

Bold, S., Ohlin, M., Garten, W. & Radsak, K. (1996). Structural domains involved in Human Cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) mediated cell- cell fusion. J. Gen. Virol. 77: 2297-2302.

Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C. M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchinson, C. A., Kouzarides, T., Martignetti, J. A., Preddie, E., Satchwell, S. C., Tomlinson, P., Weston, K. M.& Barrell, B. G. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequenze of human cytomegalovirus strani AD169. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154: 125-169.

Compton, T., Nepumoceno, R. R., Nowlin, D. M. (1992). Human cytomegalovirus penetrates host cells by ph- independent fusion at the cell surface. Virology 191: 387-395.

Compton, T, Nowlin, D. M., Cooper, N. R.(1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. Virology 193: 834-841.

Dal Monte, P., Bessia, C., Landini, M. P., Michelson, S. (1996): Expression of human cytomegalovirus ppUL83 (pp65) in a stable cell line and its association with metaphase chromosomes. Journal of general virology 77: 2591-2596.

Depto, A. S., Stenberg, R. M. (1989). Regulated expression of the Human cytomegalovirus pp65 gene: Octamer sequence in the promotor is required for activation by viral gene products. Journal of virology 63: 1223- 1238.

Eggers, M., Bogner, E., Agricola, B., Kern, H. F. & Radsak, K. (1992). Inhibition of human cytomegalovirus maturation by brefeldin A. J. Gen. Virol. 73: 2679- 2692.

Gallina, A., Simoncini, L., Garbelli, S., Percivalle, E., Perorali- Noy, G., Le, K. S., Erikson, R. L., Plachter, B., Gerna, G. & Milanesi, G. (1999). Polo- like kinase 1 as a target for human ctomegalovirus pp65 lower matrix protein. J. Virol. 73: 1468- 1478. Gallina, A., Percivalle, E., Simoncini, L., Revello, M. G., Gerna, G., Milanesi, G. (1996). Human cytomegalovirus pp65 lower matrix phosphoprotein harbours two transplantable nuclear localization signals. Journal of general virology77: 1151-1157.

Geballe, A. P., Leach, F. S., Mocarski, E. S. (1986). Regulation of cytomegalovirus late gene expression: gamma genes are controlled by posttranscriptional events. Journal of virology 57: 864-874.

Gibson, W. (1983). Protein counterparts of human and simian cytomegalovirus. Virology 128: 391-406.

Gibson, W. (1993). Molecular biology of human cytomegalovirus. In Molecular aspects of human cytomegalovirus, S. 303- 329. Y. Becker & G. Darai (Ed.). Heidelberg: Springer- Verlag.

Grefte, J. M. M., van der Gun, B. T. F., Schmolke, S., van der Giessen, M., van Son, W. J., Plachter, B., Jahn, G. & The, T. H. (1992). The lower matrix protein pp65is the principial viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. J. Gen. Virol. 73: 2923- 2932.

Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S. & Rapoport, T. A. (1992). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. Nature 375: 47-52.

Gupta, P., Joer, S. & Rapp, F. (1977). Comparison of the polypeptides of several stains of human cytomegalovirus. J. Gen. Virol. 34: 447- 454.

Hempelmann, E. & Kaminsky, R. (1986). Elektrophoresis 7: 481-481.

Hensel, G., Meyer, H., Gärtner, S., Brand, G., Kern, H. F. (1995). Nuclear localization of the human cytomegalovirus tegument protein pp150 (ppUL32). Journal of general virology 76: 1159- 1601.

Hensel, G., Meyer, H., Buchmann, I., Pommerehne, D., Schmolke, S., Plachter, B., Radsak, K., Kern, H. F. (1996). Intracellular localization and expression of the human cytomegalovirus matrix phosphoprotein pp71 (ppUL82): evidence for its translocation into the nucleus. Journal of general virology 77: 3087-3097.

Irmiere, A. & Gibson, G. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion- like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. Virology 130: 118-133.

Kaerber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 162: 480.

Kari, B. & Gehrz, R. (1992). A human cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin- binding component of the envelope. J. Virol. 66: 1761-1764.

Keay, S., Merigan, T. C., Rasmussen, L. (1989). Identification of cell surface receptors for the 86- kilodalton glycoprotein of human cytomegalovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10100-10103.

Keay, S. & Baldwin, B. (1991). Anti- idiotype antibodies that mimic gp 86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. J. Virol. 66: 4834-4838.

Klages, S., Rüger, B., Jahn, G. (1989). Multiplicity dependent expression of the predominant phosphoprotein pp65 of the human cytomegalovirus. Virus Research 12: 159- 168.

Kim, K. S., Sapienza, V., J., Carp, R. I. & Moon, H. M. (1976). Analysis of structural polypeptides of purified human cytomegalovirus. J. Virol. 20: 604-611.

Klof, M. (1983). Zytomegalie-Virus-Infektion. Fotschr. Med. 101: 1155-1160

Landini, M. P., Severi, B., Furlini, G., Badiali De Giorni, L. (1987). Human cytomegalovirus structural components: intracellular and intraviral localization of p28 and p65- 69 by immunoelectron microscopy. Virus Research 8: 15- 23.

Landini, M. P., Spaete, R. P.(1993). Human Cytomegalovirus structural proteins: a report of the first nomenclature workshop. In Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease., S.65-74. S. Michelson & S. A. Plotkin (Ed.). Amsterdam: Elsevier.

Liu, B., Stinski, M. (1992). Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP- 1 cis- acting elements. Journal of virology 66: 4434- 4444.

Lowry, O. H., Rosenborough, M. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Meyer, H. H., Ripalti, A., Landini, M. P., Radsak, K., Kern, H. F. & Hensel, G. M. (1997). Human cytomegalovirus late- phase maturation is blocked by stably expressed UL32 antisense mRNA in astrocytoma cells. Journal of virology78: 2621-2631.

Mocarski, E. S. (1993). Cytomegalovirus biology and replication. In The human herpesviruses, S. 173-226. B. Roizman, R. J. Whitley & C. Lopez (Ed.). New York: Raven Press.

Nowlin, D. M., Cooper, N. R., Compton, T. (1991). Expression of a human cytomegalovirus receptor correlates with infectibility of cells. Journal of virology 65: 3114-3121.

Plachter, B. Klages, S., Hagelmann, S., Britt, W., Landini, M. P. & Jahn, G. (1990). Procaryotic expression of phosphorylated tegument protein pp65 of human cytomegalovirus and application of recombinant peptides for immunoblot analyses. J. Clin. Microbiol. 28: 1229-1235.

Prichard, M. N., Britt, W. J., Daily, S. L., Hartline, C. B., Kern, E.R. (2005). Human cytomegalovirus UL97 Kinase is required for the normal intranuclear distribution of pp65 and virion morphogenesis. Journal of virology 79: 15494- 15502.

Radsak, K., Schneider, D., Jost, E., Brücher, K. H. (1989). Alteration of nuclear lamina protein in human fibroblasts infected with cytomegalovirus (HCMV). Archives of Virology 105: 103-112.

Radsak, K., Brücher, K. H., Georgatos, S. D. (1991). Focal nuclear envelope lesions and specific nuclear lamin A/C dephosphorylation durin infection with human cytomegalovirus. European Journal of Cell Biology 54: 299- 304.

Radsak, K., Kern, H., Reis, B., Reschke, M., Mockenhaupt, T. & Eickmann, M. (1995). Human cytomegalovirus: Aspects of viral morphogenesis and of processing and transport of viral glycoproteins. In DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechnisms, S. 295-312. H. Friedmann & G. Barbanti- Brodano (Ed.) New York: Plenum Press.

Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A., Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. Archives of Virology 141: 557-572.

Revello, M. G., Percivalle, E., Di Matteo, A., Morini, F. & Gerna, G. (1992). Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. J. Gen. Virol. 73: 437-442.

Riley, H.D. Jr. (1997). History of the cytomegalovirus. South Med. J. 90: 184-190.

Rixon, F. J. (1993). Structure and assembly of herpesviruses. Semin Virol 4: 135-144.

Roizman, B. (1993). The Family Herpesviridae. In The Human Herpesviruses, S.1-9. B. Roizman, R. J. Whitley & C. Lopez (Ed.). New York: Raven Press.

Sanchez, V., Angeletti, P. C., Engler, J. A. & Britt, W. J. (1998). Localization of human cytomegalovirus structural proteins to the nuclear matrix of infected human fibroblasts. J. Virol. 72: 3321-3329.

Sarov, I. & Abady, I. (1975). The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptid characterization of cytomegalovirions and dense bodies. Virology 66: 464- 473.

SimonC, Stille W. (2000). Zytomegalie (CMV). In Antibiotika- Therapie in Klinik und Praxis, S. 617-618. Stuttgart; New York: Schattauer.

Schmolke, S., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995 a). Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. Journal of virology 69: 1071-1078.

Schmolke, S., Kern, H. F., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995 **b**). The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. Journal of virology 65: 5959-5968.

Severi, B., Landini, M.P., Cenacchi, G., Zini, N., Maraldi, N. M. (1992). Human cytomegalovirus nuclear and cytoplasmic dense bodies. Archives of Virology 123: 193-207.

Spaete, R. R., Gehrz, R. C. & Landini, M. P. (1994). Human cytomegalovirus structural proteins. J Gen Virol 75: 3287-3308

Spearman, C. (1908). Brit. J. Psychol. 2: 227.

Sodeik, B., Ebersold, M. W. & Helenius, A. (1997). Microtuble- mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. J. Cell Biol. 136.

Somogyi, T., Michelson, S. & Mass, M. J. (1990). Genomic location of human cytomegalovirus protein with protein kinase activity (PK68). Virology 174: 276-285.

Stamminger, T. & Fleckenstein, B. (1990). Immediate- early transcription of human cytomegalovirus. In Cytomegaloviruses, S. 3-19. J. K. MCDougall (Ed.). Berlin: Sprinter- Verlag.

Taylor, H. P., Cooper, N. R. (1989). Human cytomegalovirus binding to fibroblasts is receptor mediated. Journal of virology 63: 3991- 3998.

Taylor, H. P., Cooper, N. R. (1990). The human cytomegalovirus receptor on fibroblasts is a 30- kilodalton membrane protein. . Journal of virology 64: 2484-2490.

Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. & Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. Eur. J. Cell. Biol. 60: 163-178.

Welch, A. R., Woods, A. S., McNally, L.M., Cotter, R. J. & Gibson, W.(1991). A herpesvirus maturational protease, assembling: Identification of its gene, putative active site domain and cleavage site. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 10792-10796.

Wood, L. J., Baxter, M. K., Plafker, S. M., Gibson, W. (1997). Human cytomegalovirus capsid assembly protein precursor (pUL80.5) interacts with itself and with the major capsid protein (pUL86) through two different domains. Journal of virology 71: 179- 190.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Zu meinen akademischen Lehrern gehörten folgende Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg, dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH (Standort Marburg) und der Klinikum Fulda gAG, Lehrkrankenhaus der Philipps-Universität Marburg:

Arnold Ganz Kienapfel Aumüller Kleine Gemsa Barth Geus Klenk Basler Göke Klose Baum Görg Koch **Beato** Gotzen Koolmann Behr Gressner Koop Berger Griss Krause Kretschmer Bien Gröne **Bohner** Grün Kroll **Bonzel** Grzeschik Kummer Czernik Haas Lang Habermehl Daut Langohr Dölp Happle Lauer Doss Havemann Legrum Draf Hertel Lennartz Effendy Hilgermann Lorenz Engel Höffkes Maisch Eschenbach Höfken Manke Fassbinder Hoffmann Martin Fehmann Hofmann Mennel

Feldmann Jaspersen Moll
Feuser Joseph Moosdorf
Fritz Kalbfleisch Müller
Fruhstorfer Kälble Mutters
Fuhrmann Kern Oertel

Röhm

Westermann

Rumpf Stegmann Perst Schachtschabel Steinmetz Peters Pfab Schäfer Sturm Podszus Schmitz-Moormann Thomas Pohlen Schüffel Töllner Radsak Schulz Vohland Rehder Schwarz Voigt Remschmidt Seifart von Wichert Richter Seitz Wallenfang Rogausch Seyberth Werner

Rothmund Spätling Westphal

Slenczka

Für meine Ausbildung möchte ich mich bei Ihnen herzlich bedanken.

Anhang: Danksagung 116

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Kern und Frau Dr. Gabriele Hensel für die freundliche Überlassung des Themas, die Unterstützung während der Arbeit und ihre vielen Anregungen.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Elsässer für seine weitreichende Unterstützung und unermüdliche Bereitschaft zu hilfreichen Diskussionen.

Ferner gilt mein besonderer Dank auch Frau B. Agricola, Herrn V. Kramer und Herrn R. Rösser für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung in Labor und Fotolabor.

Den Mitarbeitern des Instituts für Zytobiologie und Zytopathologie in Marburg danke ich für die angenehme und familiäre Atmosphäre und die geduldige Anleitung.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann und meinen Eltern für Ihre unermüdliche Ermunterung.