Institut für Virologie

Universitätsklinikum Ulm

Prof. Dr. T. Mertens

Einfluss der Zytomegalievirus-Infektion auf die Expression des Matrix-Metalloproteinase-2- Gens

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von

Thomas Haber

aus

Heiningen

2007

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Detlef Michel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Walter Just
Tag der Promotion:	25. Oktober 2007

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung..... 1
1.1 Einteilung der Herpesviren.....1
1.2 Das humane Cytomegalievirus (HCMV).....2
1.2.1 Biologie des HCMV.....2
1.2.1.1 Virionstruktur und Genom.....2
1.2.1.2 Replikation und Infektionszyklus.....3
1.2.1.3 Interaktion mit der Wirtszelle bzw. dem Wirtsorganismus..... 5
2.2.2 Medizinische Bedeutung und Epidemiologie.....6
1.3 Die Extrazelluläre Matrix..... 9
1.4 Matrix-Metalloproteinasen (MMP's)..... 10
1.4.1 MMP's im Allgemeinen.....10
1.4.1.1 Funktion, Nomenklatur und Einteilung der MMP's.....10
1.4.1.2 Allgemeine Proteinstruktur der MMP's.....12
1.4.2 Die Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2)..... 13
1.4.2.1 Charakteristika der Matrix-Metalloproteinase-2..... 13
1.4.2.2 Struktureigenschaften des MMP-2-Gens.....15

2. Zielsetzung der Arbeit.....17

3. Material und Methodik..... 18
3.1 Chemikalien, Enzyme bzw. Proteine Nukleotide häufig verwendete Lösungen und andere Verbrauchsmaterialen..... 18
3.2 Geräte..... 27
3.3 Methoden.....29
3.3.1 Zellkultur und Viren.....29
3.3.1.1 Kultivierung von HFF-Zellen.....29
3.3.1.2 Herstellung zellfreier Virusstocks..... 29
3.3.1.3 Virustiterbestimmung.....30
3.3.1.4 Virusinaktivierung.....31
3.3.1.5 Infektion von HFF's.....31
3.3.1.6 Bestimmung der Zellzahl..... 32
3.3.2 Molekularbiologie..... 32
3.3.2.1 RNA-Extraktion und Quantifizierung.....32
3.3.2.2 Gewinnung genomischer DNA aus HFF-Zellen..... 33
3.3.2.3 RT-PCR zur Amplifikation von RNA-Sequenzen im Rahmen der Herstellung der Northern-Blot-Sonde.....34
3.3.2.4 Touchdown-PCR zur Amplifikation von DNA-Sequenzen im Rahmen der Herstellung geeigneter Plasmide für Transfektionsexperimente..... 35
3.3.2.5 Klonierungen von DNA-Fragmenten in Vektoren..... 36

3.3.2.6 Herstellung transfektionskompetenter Bakterien……38
3.3.2.7 Transformation kompetenter Zellen…… 39
3.3.2.8 Plasmidvermehrung und Extraktion im analytischen Maßstab (Mini-Präp)……39
3.3.2.9 Plasmidvermehrung und Extraktion im präparativen Maßstab (Maxi-Präp)……...40
3.3.2.10 Allgemeiner Ansatz zum Restriktionsverdau (Northern-Sonden)…… 41
3.3.2.11 Anlegen von Glycerinkulturen…… 42
3.3.2.12 Ethanolfällungen…… 42
3.3.2.13 DNA-Sequenzierungen……44
3.3.2.14 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA zur Analyse und Präparation……...45
3.3.2.15 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen…… 46
3.3.2.16 Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration mittels OD-Methode am Photometer…….. 46
3.3.2.17 Transiente Expression und Luciferase-Assay..... 47
3.3.2.18 Northern-Blot.....48
3.3.2.19 Western-Blot……52
3.3.2.20 Zymographie……54
3.3.3 Statistische Methoden.....57

4. Ergebnisse…….. 59
4.1 Veränderung in der MMP-2-Promotor-Aktivität in HFF-Zellen durch eine HCMV-Infektion…… 59
4.2 Veränderung der MMP-2-m-RNA-Level in HFF- Zellen infolge einer HCMV-Infektion……64
4.3 Veränderung der MMP-2-Aktivität in Bezug auf die Zellzahl sowie der Produktion an Gesamtprotein…… 67
4.3.1 Ergebnisse der Zymographie……..67
4.3.2 Relative Zellzahlen in Abhängigkeit von Infektionsstatus und Infektionsdauer…… 70
4.3.3 Ergebnisse des Western-Blots mit Vimentin…… 71

5. Diskussion……..74
5.1 Einordnung der Ergebnisse über die MMP-2-Regulation in den Gesamt-Zusammenhang der Regulation von Wirtszellproteinen infolge einer HCMV-Infektion……74
5.2 Mögliche andere Ursachen für eine Abnahme der ECM…… 80
5.3 Unterschiede in der MMP-2-Regulation unter dem Einfluss einer HCMV- Infektion in Abhängigkeit von der Zellart…… 80

6. Zusammenfassung und Ausblick…… 82

7. Literaturverzeichnis……84

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	„*acquired immunodeficiency syndrome*“ =erworbenes Immunschwäche-Syndrom
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaare
BSA	„*bovine serum albumine*“ = Rinderserum-Albumin
CMV	„*cytomegalovirus*“ = Zytomegalievirus
CPE	„*cytopathic effect*“ = zytopathischer Effekt
Da	Dalton
E	„*early*“
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECM	„*extracellular Matrix*“ = extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMMPRIN	“*extracellular matrix metalloproteinase inducer*” = Induktor von Matrix-Metalloproteinasen
FCS	„*fetal calf serum*“ = fetales Kälberserum
GAG	glykosilierte Aminoglykane
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gB	Glykoprotein B
gH	Glykoprotein H
gp	Glykoprotein
HCMV	„*human cytomegalovirus*“ = humanes Zytomegalievirus
HFF	„*human foreskin fibroblasts*“ = humane Vorhautfibroblasten
HHV	humanes Herpesvirus
HLA	„*human leucocyte antigen*“ = humanes Leukozyten-Antigen
HSV	Herpes Simplex Virus
i	mit HCMV-Laborstamm AD 169 infiziert
ia	mit UV-inaktiviertem HCMV-Laborstamm AD 169 inokuliert
IE	„*immediate early*“
IPTG	Isopropyl-D-1-thiogalactopyranosid
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton

L	„*late*“
m	„*mock-infiziert*“ - mit Mock-Lösung inocculiert
MEM	„*minimal essential medium*“
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOI	„*multiplicity of infection*“
MOPS	3-(N-Morphonliono)propansulfonsäure
MT	„*Membrane-Type-“*
NIEP’s	„*non-infectious enveloped particles*“
OD	optische Dichte
ORF	„*open reading frame*“ = offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*phosphate buffered saline* (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	“*polymerase-chain-reaction*”= Polymerase-Ketten-Reaktion
pp	Phospho-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„*rounds per minute*“ = Umdrehungen pro Minute
RS	“*Respiratory-Syncytial*-“
RT	Raumtemperatur
SDS	“*sodiumdodecylsulfat*” = Natriumdodecylsulfat
SMC	“*smooth-muscular-cell*” = glatte Muskelzelle (n)
sog.	so genannt
SSC	Saline sodium citrat
TEMED	Tetramethylendiamin
TYP	“*tryptone-yeast extract phosphate*” = Trypton-Hefe-Extract- Phosphat (-Medium)
UL	“*unique long*”
US	“*unique short*”
UV-	Ultraviolett-
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galactosid

1. Einleitung

1.1. Einteilung der Herpesviren

Aufgrund von Wirtsspektrum, Replikationsgeschwindigkeit und Zelltropismus lässt sich die Familie der Herpesviridae in drei Unterfamilien, nämlich *α-, β-, γ-Herpesvirinae*, einteilen.

Die Unterfamilie der *α-Herpesvirinae* zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum und eine kurze Replikationszeit aus. Im Stadium der Latenz halten sie sich vor allem in den Nervenzellen der Spinalganglien auf (Wagner u. Bloom 1997).

Zu ihren Vertretern gehören die Lippen- und Genital-Herpes hervorrufenden Erreger Herpes simplex Virus I und II und das Windpocken und bei Reaktivierung Gürtelrose verursachende Varizella-Zoster-Virus.

Die *β-Herpesvirinae* dagegen zeigen ein enges Wirtsspektrum, ihr Replikationszyklus ist langsamer. Humanpathogene Vertreter dieser Unterfamilie sind die Zytomegalieviren, die humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6 u. HHV-7). Der Subtyp HHV-6B verursacht das Exanthema subitum, welches wegen seines kurzen, fiebrigen Verlaufs auch als Dreitagefieber bekannt ist. Der Name Zytomegalievirus leitet sich von dem durch CMV verursachten, typischen zytopathischen Effekt (kurz: CPE) ab - man beobachtet eine starke Größenzunahme und Abrundung der Zellen. Zellen, in welchen sich die *β-Herpesvirinae* während der Latenzphase aufhalten, sind hauptsächlich Blutzellen, wahrscheinlich v.a. von Monozyten abgeleitete Makrophagen, sowie Endothelzellen (Prösch et al. 1999; Jarvis u. Nelson 2002).

Die *γ-Herpesvirinae* schließlich besitzen auch ein enges Wirtsspektrum, die Replikationszeiten jedoch sind innerhalb dieser Unterfamilie sehr unterschiedlich. Gemein ist ihnen der Zelltropismus – sowohl im aktiven als auch im latenten Stadium sind vor allem Zellen des lymphatischen Systems ihre Wirtszellen. Jedoch können einige Vertreter auch Epithel- oder Fibroblastenzellen lytisch infizieren.

Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind einerseits das Epstein-Barr-Virus (EBV), der Erreger der infektiösen Mononukleose - auch bekannt als das Pfeiffersche

Drüsenfieber - und andererseits das humane Herpesvirus 8 (HHV-8). Beide Erreger werden auch mit der Entwicklung von Tumoren in Verbindung gebracht.

1.2 Das humane Zytomegalievirus (HCMV)

1.2.1 Biologie des HCMV

1.2.1.1 Virion-Struktur und Genom

Das HCMV-Virion gleicht morphologisch den anderen Vertretern der Herpesviren. Wie sie alle, besitzt auch das HCMV ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom, welche von einem Kapsid und einer Hülle (Envelope) umgeben ist. Es wird von einer als Tegument bezeichneten, amorphen Matrix umgeben (McGavran u. Smith 1965; Wright et al. 1964).

Bei dem als Knospung bezeichneten Vorgang wird das Kapsid von einer Hülle umgeben, welche von der inneren Kernmembran gebildet wird. In diese Membran sind Glykoproteine eingelagert, die bei der Adsorption der Viruspartikel an die Wirtszelle und bei der Penetration in die Zelle eine wichtige Rolle spielen. Sie besitzen antigene Eigenschaften und können so im jeweiligen Wirtsorganismus eine schützende Antikörperantwort induzieren (Jonjic et al. 1994; Farrel u. Shellam 1991).

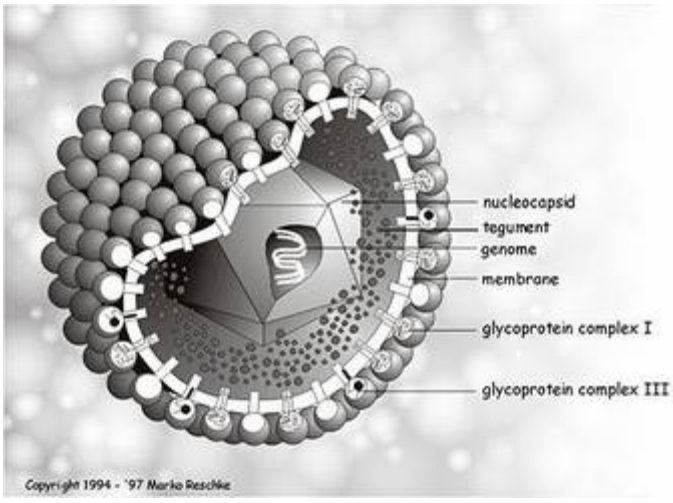


Abbildung 1 : Struktur eines HCMV-Virions

(aus : http://www.biografix.de ; M. Reschke und M. Eichmann)

Insgesamt besitzt das reife HCMV-Virion einen Durchmesser von 150-200 nm (Wright et al. 1964).

Neben diesen infektiösen Partikeln können zwei weitere, nicht infektiöse Partikel freigesetzt werden (Irmiere u. Gibson 1983). Die einen werden als *non-infectious enveloped particles* (NIEPs) bezeichnet und besitzen eine ähnliche Struktur und Proteinzusammensetzung wie die infektösen Virionen, enthalten jedoch keine DNA. Den anderen nicht infektiösen Partikeln fehlen neben der DNA auch noch das Kapsid. Sie werden *dense bodies* genannt und bestehen vorwiegend aus einem unterschiedlich großen Aggregat an Tegumentprotein.

Das Genom des HCMV stellt mit etwa 230 kbp eines der größten unter den bekannten, humanpathogenen Viren dar. Es codiert für etwa 200 Genprodukte.
Das doppelsträngige, lineare DNA-Genom besteht aus einem langen, dem sog. *unique long* (=UL) Fragment und einem kurzem, dem sog. *unique short* (=US) Fragment. Beide sind nicht repetetiv, deshalb die Bezeichnung *unique*. Sie werden jeweils von repetitiven, invertierten Abschnitten, den *inverted repeats* und *terminal repeats*, flankiert.
Das Genom des vollständig sequenzierten HCMV-Laborstammes AD 169 enthält insgesamt 208 sog. offene Leserahmen (Open Reading Frames – ORFs), Wichtig sind diese ORFs für die einheitliche Nomenklatur der durch HCMV codierten Genprodukte.

1.2.1.2 Replikation und Infektionszyklus

Ein kompletter Replikationszyklus des HCMV benötigt *in vitro* etwa 48-72 h. Obwohl *in vivo* vielerlei Zellarten durch HCMV infiziert werden können, beschränkt sich dies in der Zellkultur auf sehr wenige Zellentitäten. Am produktivsten geschieht eine Infektion durch HCMV bzw. dessen Replikation in primären, differenzierten Fibroblasten, wie z.B. humanen Vorhautfibroblasten (engl.: *Human Foreskin Fibroblasts* –kurz: HFF's).

Der Infektionszyklus beginnt mit der Anbindung der Virionen an Heparansulfate auf der Wirtszelloberfläche (Compton et al. 1993). Die spezifische Adsorption ist hierbei wahrscheinlich über die viralen Glykoproteine gp B und gp H vermittelt. Seitens der Zelle sind es nicht näher bezeichnete Bindungsproteine in der Größenordnung von 30 kDa (Taylor u. Cooper 1990) und 92 kDa (Keay et al. 1989). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass HCMV über eine Bindung an den EGF-Rezeptor der Wirtszelle die HCMV-getriggerte Signalkaskade in der Zelle beeinflusst. Außerdem soll der EGF-Rezeptor essentiell sein für das Eindringen des Viruspartikels in die Zelle (Wang et al. 2003). Nach Fusion der Virushülle mit der Wirtsmembran kommt es zur Penetration des Viruspartikels in die Zelle. Da das Glykoprotein B (gp B = gpUL 55) eine fusogene Domäne zur Vermittlung von Zell-Zell-Fusionen besitzt, wird vermutet, dass es am Verschmelzungsprozess beteiligt sein könnte (Bold et al. 1996). Ist das Virus in die Wirtszelle eingedrungen, trennen sich Tegument und Kapsid. Das Kapsid gelangt dann zur Kernhülle, wo dann nach Proteolyse des Kapsid, dem sog. uncoating, die virale DNA auf noch ungeklärte Weise weiter in den Kern transportiert wird.

Die nun folgende Genexpression ist abhängig von der Transkriptions- und Translations-Maschinerie der jeweiligen Wirtszelle. Sie erfolgt kaskadenartig und in strenger, zeitlicher Reihenfolge, da die Transkription des Gens einer Phase von der jeweiligen vorherigen Phase abhängig ist. Grob lässt sich die Genexpression in drei Phasen einteilen: in eine sehr frühe*(Immediate Early=IE*), eine frühe (*Early=E*) und eine späte (*Late* = L) Phase.

In der IE-Phase, welche bereits wenige Minuten bis eine Stunde nach Infektion beginnt, steht die Genexpression unter dem Einfluss des sehr starken *Major Immediate Early Promotor* (MIEP). Am stärksten werden in dieser Phase die Proteine IE1 und IE2 exprimiert. Beide spielen eine wichtige Rolle in der Transkription sowohl zellulärer als auch viraler Gene in der HCMV-infizierten Zelle (Wing et al. 1998; Schaarschmidt 2000).

Etwa drei Sunden nach Infektion beginnt die Early-Phase, in welcher ebenfalls Proteine synthetisiert werden, die auf den Zellstoffwechsel einwirken. Die wichtigsten Genprodukte dieser Phase sind jedoch Proteine, welche zur Replikation viraler DNA erforderlich sind.

Zum Beispiel gehört die virale DNA-Polymerase (UL 54), die ein Hauptangriffspunkt antiviraler Substanzen darstellt, zu den prominentesten Vertretern der *Early*-Phase.
Ca. 24h-36h nach Infektion findet schließlich der Wechsel zur *Late*-Phase statt. In dieser werden in Abhängigkeit der viralen DNA-Synthese vor allem Strukturproteine des Viruskapsids sowie die Glykoproteine für die Virushülle synthetisiert.

Synthese viraler DNA Virusreifung und Virusfreisetzung:
Nach Replikation der viralen DNA wird diese zunächst zirkularisiert bevor dann im Rahmen der sog. *„rolling-circle“* -Synthese die Endlos-DNA entsteht. Durch spezifische Spaltung an den sog. *cleavage-sites* wird die Endlos-DNA schließlich auf Genomlänge geschnitten und anschließend in Kapside verpackt.
In dem als Virusreifung bezeichneten Vorgang erhalten die Kapside eine Virionhülle. Beim Verlassen der Zelle fusioniert die äußere davon mit der Plasmamembran der Wirtszelle, so dass schließlich einfach umhüllte Viruspartikel freigesetzt werden.

1.2.1.3 Interaktion mit der Wirtszelle bzw. dem Wirtsorganismus

Wie im Folgenden gezeigt, gibt es im Falle eines Befalls mit HCMV vielerlei Interaktionen mit der Wirtszelle.
Makroskopisch ersichtlich ist der typische zytopathische Effekt (CPE) – die hierbei auftretende Aufblähung und Abrundung der Zelle ist praktisch pathognomonisch für eine HCMV-Infektion.
Im Lichtmikroskop erkennt man außerdem die ebenfalls typischen Zellkerneinschlüsse. Sie entsprechen akkumulierten Nukleokapsiden und führen zum Bild der Eulenaugenzellen – auch heute noch ein wichtiges zytologisches Diagnostikum für eine HCMV-Infektion.
Darüber hinaus beeinflusst HCMV natürlich auch die Stoffwechselvorgänge der Wirtszelle auf Ebene der RNA–, DNA- und Proteinsynthese. Im Gegensatz zu vielen anderen Herpesviren kann dieser Einfluss auch stimulatorisch sein (Mocarski 1996; Schaarschmidt 2000), jedoch kann auch eine Hemmung in der Expression

bestimmter zellulärer Gene durch HCMV beobachtet werden (Zhu et al. 1998; Schaarschmidt 2000).

Sehr früh nach Infektion führen die in der Wirtszelle neu synthetisierten viralen Proteine IE1 und IE2 zu einer Modulation der zellulären Transkription (Malone et al. 1990; Schaarschmidt 2000; Pizzorno et al. 1988; Stenberg et al.1990).

Zu einem späteren Zeitpunkt nach Infektion kommt es, praktisch durch Versklavung des Zellstoffwechsels mittels HCMV, zum Stopp des Zellzykluses im Übergang von G1 zur S-Phase (Bresnahan et al 1996; Dittmer u. Mocarski 1997; Lu u. Shenk 1996) mit konsekutiver Störung der zellulären Genexpression. Schließlich kommt der Zellstoffwechsel durch die exzessive Virusproduktion fast ganz zum Stillstand, bevor die Zelle unter Virusfreisetzung zugrunde geht.

Insgesamt zeigt sich ein breites Spektrum an Beeinflussung der Wirtszelle bzw. des Wirtszellorganismus. Dennoch sind die genauen Modi der Interaktionen, nämlich wie und auf welcher Ebene etwas beeinflusst wird nur sehr unzureichend bekannt.

So weiß man immer noch wenig über die Mechanismen der Latenz und der Reaktivierung. Ebenso wenig sind die Vorgänge und Kausalitäten, die zum CPE führen, erforscht. Da elektronenmikroskopisch eine Reduktion bzw. Umbau der extrazellulären Matrix auffällt, wird vermutet, dass es durch die Infektion zu einer Modulation der Synthese der Matrixproteine selbst oder auch solcher Proteine, welche den Umbau bzw. Abbau regulieren, kommt (Schaarschmidt 2000).

1.2.2 Medizinische Bedeutung und Epidemiologie

Das humane Zytomegalievirus ist ein ubiquitär verbreitetes, ausschließlich humanpathogenes Virus. Der Durchseuchungsgrad schwankt je nach sozioökonomischem Status und geographischer Lage der untersuchten Population insgesamt zwischen 30-100% bei der erwachsenen Bevölkerung.

So wird in ländlichen Gebieten eine Durchseuchung von ca. 50% beobachtet, wohingegen sie in städtischen Ballungszentren bis zu 100% beträgt. Auch in Entwicklungsländern liegt die Rate bei 80-100% (Mertens 1999).

Die Virusübertragung kann sowohl vertikal (intrauterin-pränatal: Mutter auf Kind) als auch horizontal (extrauterin - peri-und postnatal) erfolgen. Perinatal wird das Virus v.a. durch Kontakt mit infektiösen Zervixschleim auf den Säugling übertragen. Postnatal kann sich der Säugling in erster Linie über die Muttermilch infizieren (Vochem et al. 1998).

Außerhalb der Säuglingsperiode erfolgt eine Infektion meist durch Kontakt mit infektiösem Speichel, durch ungeschützten Geschlechtsverkehr oder durch Schmierinfektionen (Ho1982; Sinzger u. Jahn 1996). Darüber hinaus stellen auch Blutprodukte oder transplantierte Organe eine wichtige Infektionsquelle dar (Rubin et al. 1979; Klof 1983; Glenn 1981), weshalb heute eine umfangreiche Testung dieser Produkte bzw. Organe auf HCMV erfolgt.

Die klinische Verlaufsform einer HCMV-Infektion ist abhängig vom Immunstatus des Infizierten:

Bei immunkompetenten verläuft eine Primärinfektion meist klinisch inapparent. Selten zeigt sich ein mononukleose-ähnliches Krankheitsbild. Der Verlauf ist dann grippeähnlich - mit Vergrößerung der Tonsillen, Milz- und Lymphknotenschwellung und Leberbeteiligung, welche sich meist nur durch leichte Schmerzen im Oberbauch und durch Anstieg der Transaminasen bemerkbar macht.

Klinisch weitaus wichtiger sind Primärinfektionen bzw. die Reaktivierung nicht - immunkompetenter Personen, bei denen das Immunsystem noch nicht unausgereift ist (wie beim Fetus), eine angeborene Immunschwäche besteht, oder das Immunsystem auf eine andere Weise geschwächt ist. Beispiele für letzteres sind einerseits die durch das HI-Virus hervorgerufene Erkrankung AIDS, andererseits die erwünschte immunsuppressive Therapie bei Organtransplantat-Empfänger, sowie die unerwünschte Immunsuppression durch Zytostatika-Therapie.

Bei diesen Kollektiven, bei welchen überwiegend die zelluläre Immunität gestört ist, kommt es nicht nur häufiger zu einem klinisch apparenten Verlauf, auch verläuft v.a. eine Primärinfektion aber auch eine Reaktivierung weitaus schwerwiegender. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Art und Stärke der Immunsupression das Ausmaß und auch die Organmanifestation der HCMV-Infektion bestimmt (Hertenstein et al. 1995).

Kommt es bereits pränatal zu einer HCMV-Infektion, so kann es je nach Entwicklungsstadium des Embryos bzw. des Feten zu schweren Entwicklungsstörungen des Gehirn (Mikrozephalie), der Augen (Chorionretinitis) oder des Gehörs kommen (Becroft 1981; Hanshaw 1971).

Bei AIDS-Patienten manifestiert sich eine HCMV-Infektion bzw. eine Reaktivierung am häufigsten als eine Retinitis, ebenso kann es zu Enteritiden oder auch Enzephalitiden führen (Hampl et al. 1998; Jacobson u. Mills 1988). Die interstitielle CMV-Pneumonie zählt auch nach Entwicklung der CMV-wirksamen Virostatika zu den häufigsten Todesursachen bei AIDS-Patienten (Macher et al. 1983).

Nach Transplantationen solider Organe oder auch Knochenmarktransplantation kann es unter immunsuppressiver Therapie durch eine Neuinfektion bzw. durch eine Reaktivierung einer vorhergehenden Infektion zu einer Hepatitis oder Pneumonie kommen. Darüber hinaus kann eine bestehende HCMV-Infektion v.a. bei nieren- oder lebertransplantatierten Patienten über eine Entzündungsreaktion zur Abstoßung des jeweiligen Transplantates führen (Glenn 1981; Vierling u. Fenell 1985).

Nicht zuletzt soll HCMV auch evtl. eine Rolle bei der Entstehung und Progression von atheromatösen Plaques in den Gefäßen spielen (Chen et al. 2003; Degre 2003; Speir et al. 1994, Reinhardt et al. 2006). Ob jedoch der Nachweis von HCMV-Erregern bzw. deren DNA eine Kausalität bezüglich der Entstehung von Atherosklerose anzeigt, oder nur ein sekundäres Phänomen darstellt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch offen. Denkbar wäre ein kausaler Zusammenhang zwischen HCMV-Befall und der Entwicklung atheromatöser Gefässplaques über eine Modulation der extrazellulären Matrixproteine (Haug et al. 2004; Reinhardt et al. 2006).

1.3 Die extrazelluläre Matrix (ECM)

Als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet man die komplex zusammengesetzte Interzellularsubstanz, in welcher die Zellen eingebettet sind. In den meisten parenchymatösen Organen wie Leber, Niere, Milz etc. sowie im Muskelgewebe, stellt sie nur einen schmalen Spalt zwischen den Zellen dar, wohingegen in Geweben wie Knochen und Knorpel Ausdehnung der ECM sehr ausgeprägt ist.

Die ECM sorgt für die mechanische Unterstützung aller Gewebe. Ihre Zusammensetzung bestimmt die Struktur und Funktion des jeweiligen Gewebes.
So vermittelt die ECM in der Niere beispielsweise Filterfunktion, in der Embryonalphase dient sie vor allem als Gerüst für Zellmigrationsvorgänge. Praktisch ubiquitär fungiert sie als Anhaftungsstelle für Zellen und hält diese dadurch im Zellverband, wodurch überhaupt erst die Organisation von Zellen zu Organen und Geweben möglich ist.

Prinzipiell lässt sich die extrazelluläre Matrix in 2 Hauptbestandteile einteilen:
Zum einen gibt es glykosilierte Aminoglykane (kurz: GAG's) – eine amorphe Grundsubstanz, welche aus unverzweigten Polysaccharidketten bestehen und nach Bindung an Proteine als Proteoglykane bezeichnet werden. Zu diese sog. GAG's zählen Hyaluronsäure, Chondroitin- und Dermatansulfat, Heperansulfat und Heparin, sowie Keratansulfat.
Der andere Hauptbestandteil der ECM sind die fibrillären Proteine, deren wichtigste Vertreter Kollagen, Fibrillin, Elastin und Fibronektin sind.

1.4 Matrix-Metalloproteinasen (MMP's)

1.4.1 MMP's im Allgemeinen

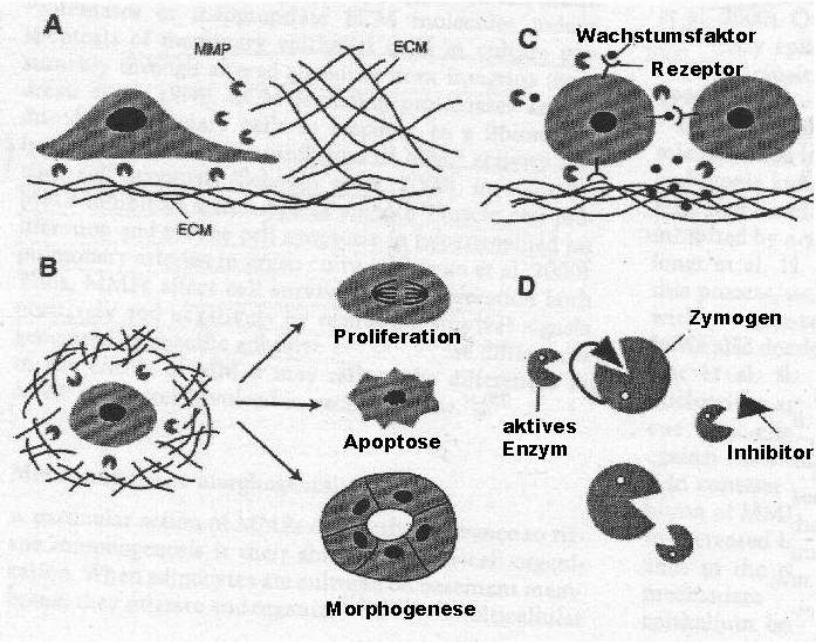
1.4.1.1 Funktion, Nomenklatur und Einteilung der MMP's

Matrix-Metallloproteinasen (MMP's) sind proteinspaltende Enzyme des extrazellulären Raumes. Als Ca^{2+} -und Zn^{2+} - abhängige, bei neutralem pH aktive, Endopeptidasen spielen sie eine entscheidende Rolle als Regulatoren von Ab- und Umbauvorgängen der ECM. So sind sie bei vielen physiologischen Prozessen wie z.B. der Zellmigration in der Morpho- bzw. Organogenese, der Wundheilung, der Angiogenese sowie bei Invasions-, Proliferations- und Apoptose-Vorgängen von Zellen beteiligt (Vu u. Werb 2000; Behrendtsen u. Werb 1997; Gross u. Lapiere 1962; Fisher et al. 1994; Kräling et al.1999; Woessner 1991).

Klinisch wichtig sind die MMP's jedoch auch durch ihre bedeutende Rolle in pathologischen Prozessen wie der Ausbreitung bzw. Metastasierung von Tumoren (Tumorinvasion, Ablösung vom Zellverband, Angioneogenese s.o.), der Rheumatoiden Arthritis (Knorpel-Knochendestruktion) sowie der Alzheimer Erkrankung (Docherty et al. 1992; Murphy u. Hembry 1992; Peress et al. 1995; Wernicke et al. 1996).

Die MMP's wirken jedoch nicht nur extrazellulär im Abbau von der ECM, sie modulieren auch die Aktivität bioaktiver Moleküle wie Wachstumsfaktoren sowie deren Rezeptoren durch deren Spaltung oder deren Freisetzung von der ECM. Ebenso können andere Enzyme durch sie mittels proteolytischer Spaltung aktiviert oder inaktiviert werden (Vu u. Werb 2000; Sires et al.1994; Ugwu et al. 1998).

Durch die Veränderung des sog. ECM – Microenvironments schließlich nehmen MMP's wie schon erwähnt auch Einfluss auf intrazellulär gesteuerte Vorgänge wie Zellproliferation und Apoptose (Vu u. Werb 2000), was in Abbildung 2 nochmals veranschaulicht werden soll.



Beeinflussung von:

A Zellmigration

B „Microenvironment“

C bioaktiven Molekülen

D Proteasengleichgewicht

Abbildung 2: Biologische Funktionen der Matrix-Metalloproteinasen

modifizierte Abbildung aus: Matrix Metalloproteinases: effectors of development and normal physiology (Vu u. Werb 2000)

Entdeckung und Nomenklatur:

Entdeckt wurde der erste Vertreter dieser Familie im Jahre 1962, damals einfach interstitielle Collagenase genannt, heute als MMP–1 bekannt. Gross und Lapiere (Gross u. Lapiere 1962) fanden das Enzym im Schwanz einer in der Metamorphose befindlichen Kaulquappe, wo ihm bei der Resorption des Schwanz-Bindegewebes und damit für die weitere Entwicklung hin zum Frosch eine entscheidende Bedeutung beigemessen wurde.

Man kennt heute über 20 verschiedene MMP’s mit je unterschiedlichen Proteinstrukturen und Substratspezifitäten.

Eine sinnvolle Einteilung der MMP’s leitet sich einerseits aus den jeweiligen durch sie vorzugsweise abgebauten Substratgruppen ab, andererseits durch ihre spezielle Lokalisation (Vu u. Werb 2000):

Daraus ergeben sich insgesamt 4 Hauptgruppen:

- Collagenasen (z.B. MMP-1,8,13) - sie bauen primär fibrilläres Kollagen ab
- Gelatinasen (z.B. MMP-2,9) - Abbau vorwiegend denaturierter Kollagene (→ Gelatine)
- Stromalysine (z.B. MMP-3,7,10) - Abbau von nicht-Kollagen-Matrix-Moleküle
- membranassozierte sog. *Membran-Type* –MMP's (z.B. MT1-MMP = MMP–14) - transmembrane Moleküle und weniger genau charakterisierte Vertreter

1.4.1.2 Allgemeine Proteinstruktur der MMP's

Vergleichende Sequenzanalysen haben ergeben, dass auf Proteinebene die Domänen fast aller MMP's aus vier Anteilen bestehen, nämlich aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, einer katalytischen Domäne und aus einem C-Terminus. Einzige Ausnahme bildet hier MMP-7, sie besitzt keinen C-Terminus. Die membranständigen bzw. MT-MMP's besitzen Darüber hinaus eine transmembranöse Region, die Gelatinasen verfügen noch über ein Fibronectin-bindendes Modul innerhalb der katalytischen Domäne (vgl. auch 4.2.2.2) (Borkakoti 1998).

Der allgemeine Aufbau von Matrix-Metalloproteinasen in linearer Form ist in der unten abgebildeten Skizze (s. Abbildung 3**)** schematisch dargestellt.

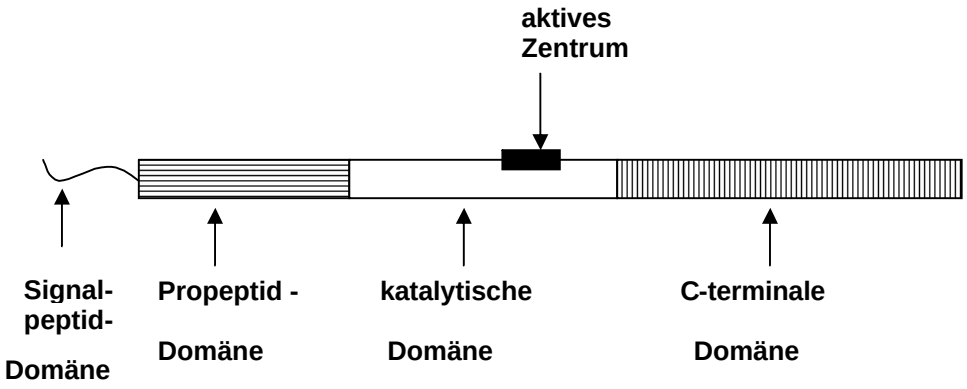


Abbildung 3: Allgemeine Domänenstruktur der Matrix-Metalloproteinasen

Für die Funktion sehr wichtige Regionen sind die *Propeptid-Domäne* und die *katalytische Domäne*. Die Erkennung des spezifischen makromolekularen Substrats wird über die C-terminale Domäne vermittelt.
Durch Entfernung der *Propeptid-Domäne* wird die jeweilige MMP's von ihrer jeweils latenten Proenzymform in die enzymatisch aktive Form überführt (s.auch1.4.1.3)
Die *katalytische Domäne* kann man sich als offenes Sandwich vorstellen (Borkakoti 1998), in denen sich zwei Zink-Ionen und mehrere Calcium-Ionen befinden.
Das eine Zink-Ion ist, wie bei anderen Metalloproteinasen, eine essentielle Komponente des aktiven Zentrums. Das zweite Zink-Ion jedoch, und das ist einzigartig unter den Metalloproteinasen, ist an der Strukturbildung der MMP's beteiligt, weshalb man hier von einem strukturellen Zink-Ion spricht (Borkakoti 1998).
Bis auf wenige Reste der den anderen Domänen angrenzenden Regionen und der Zink-bindenden Region, gibt es praktisch keinen Unterschied in der Struktur des Proenzyms zu der des aktiven Enzyms (Becker et. al. 1995).

1.4.2 Die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2)

1.4.2.1 Charakteristika der Matrix-Metalloroteinase-2 (MMP-2)

Zusammen mit der MMP-9 zählt die MMP- 2 innerhalb der Matrix-Metalloproteinasen zur Untergruppe der sog. Gelatinasen. Die MMP-2 wird deshalb auch 72 – kDa - Gelatinase oder Gelatinase A genannt. Als 92-kDa- Gelatinase oder Gelatinase B bezeichnet man die MMP-9. Ihre Benennung rührt daher, dass beide in ihrer Substratspezifität eine hohe Affinität zu sog. Gelatinen, also dentaturiertem Kollagen (v.a. Kollagen Typ III) zeigen (Liotta et al. 1981; Salo et al. 1983; Collier et al. 1988). Teilweise kursiert für die MMP-2 in der Literatur auch der Name Typ-IV-Kollagenase, da auch das in den Basalmembranen vorkommende Kollagen Typ IV ein wichtiges, von der MMP's abbaubares Substrat darstellt (Liotta et al. 1981; Salo et al. 1983; Collier et al. 1988; Brown, Bloxidge et al. 1993).

Weitere durch die MMP-2 degradierbare Substrate sind Kollagen Typ V, VII, X, sowie Elastin, Laminin (Gianelli et al. 1997), Fibronectin Aggrecan und Integrin (Brooks et al. 1996; Senior et al. 1991; Birkedal-Hansen 1995; Birkedal-Hansen et al. 1992; Woessner 1991; Salo et al. 1985; Murphy et al. 1985).

Die MMP-2 wurde ursprünglich aus dem Überstand gezüchteter, rheumtoid veränderter Synovialzellen isoliert (Okada et al. 1990). Mittlerweile hat man jedoch die MMP-2 auch in menschlichen Tumorzellen(Liotta u. Rao 1985; Liotta et al. 1979; Liotta et al. 1980; Collier et al. 1988), Endothelzellen (Kalebic et al. 1983), polymorphkernigen Leukozyten (Uitto et al. 1980), Makrophagen (Garbisa et al. 1986) und zuletzt auch in Überständen von SMC-Kulturen (Reinhardt et al. 2006) nachweisen können. Sowohl in vivo als auch in vitro scheinen aber Hautfibroblasten die Hauptproduzenten bzw. Sekretoren der MMP-2 zu sein (Collier et al. 1988).

Wie auch die anderen Matrix-Metalloproteinasen, spielt auch die MMP 2 eine wichtige Rolle im Um- und Abbau der extrazellulären Matrix (Endo et al. 1993). Da eines der Hauptsubstrate der MMP-2, wie schon erwähnt, das in den Basalmembranen vorkommende Kollagen IV ist, scheint ihr wichtigster Wirkort eben die Basalmembran zu sein. Durch die Eigenschaft denaturiertes Kollagen abzubauen, kommt der MMP-2 auch bei der dem normalen Kollagen-Turnover eine Bedeutung zu (Liotta et al. 1986; Tryggvason et al. 1987; Liotta et al. 1980). Zusammen mit der MMP-9 ist die MMP-2 auch in der Blutgerinnung von Bedeutung. MMP-2 stimuliert hierbei die Thrombozytenaggregation, wohingegen MMP-9 diese hemmt (Fernandez et al. 1999).

Vor allem der Angriffspunkt Basalmembran macht die MMP-2 zu einem wichtigen Akteur in pathologischen Prozessen wie z.B. Tumorinvasion und Metastasierung (Stetler-Stevenson et al. 1993; Liotta et al. 1991; Brown, Kleiner et al. 1993), insbesondere auch beim Pankreaskarzinom, wo sie für die desmoplastische Reaktion verantwortlich sein soll (Ellenrieder et al. 2000).

Darüber hinaus spielt die MMP-2 bei vielen Erkrankungen eine Rolle die auf einem Ungleichgewicht des Auf- und Abbaus von der ECM beruhen. Beispiele hiefür sind die Erkrankungen aus dem Formenkreis rheumatoider Arthritiden sowie die Osteopetrose bzw. Osteoporose(Martignetti et al. 2001).

In der Leber zeigte sich unter dem Einfluß von TGF-*ß*-1 eine Induktion der MMP-2-Expression bzw. eine Inhibition der MMP1 - Expression. Die durch dieses Ungleichgewicht der beiden MMP's verursachte Störung im Kollagen-Abbau führte zu exzessiven Bindegewebsvermehrung und damit zur Leberzirrhose (Milani et al. 1994).

Es gibt auch Hinweise dafür, daß virale Erreger wie das RS-Virus über Störungen der proteolytischen Aktivität und einer verstärkten MMP-2 - und MMP-9 – Expression der befallenen Zellen ein Teil ihrer Pathologie entfalten. Die proteolytische Schädigung des Lungen bzw. Bronchialgewebes könnte ein Grund für nachfolgende Superinfektionen darstellen (Girard et al. 2001). Auch soll es ein Zusammenhang zwischen hohen MMP-2 - und MMP-9 - Spiegeln und der Exazerbation von asthma-assozierten-Symptomen über eine verstärkte Infiltration von Entzündungszellen geben (Kumagai et al. 1999).

1.4.2.2 Struktureigenschaften des MMP-2 - Gens

Mit einer Größe von über 30 kbp besitzt die MMP-2 das größte Gen unter den MMP's. Im Unterschied zu anderen MMP's wie MMP-1 und den Stromalysinen, deren Genloci sich auf Chromosom 11 befinden (Spurr et al. 1988), liegt das Gen der MMP-2 beim Menschen auf Chromosom 16 (Huhtala, Eddy et al, 1990) und weist in seiner Genom- und Proteinstruktur eine starke Homologie zu anderen MMP's auf (vgl.1.4.1.2) Exon 5-7 codiert für die Fibronektin-ähnliche Kollagen-Bindungsdomäne. Der Promotorbereich des MMP-2-Gens weist keine TATA- und keine CAAT-Box auf, dafür gibt es mindestens zwei SP-1 Bindungsstellen. Diese Tatsache spricht für eine konstitutive Aktivität der MMP's v.a. in Fibroblasten (Huhtala, Chow et al. 1990; Goldberg et al. 1989; Brown, Kleiner et al. 1993).

Zur Veranschaulichung ist die Genstruktur in der Abbildung 4 dargestellt.

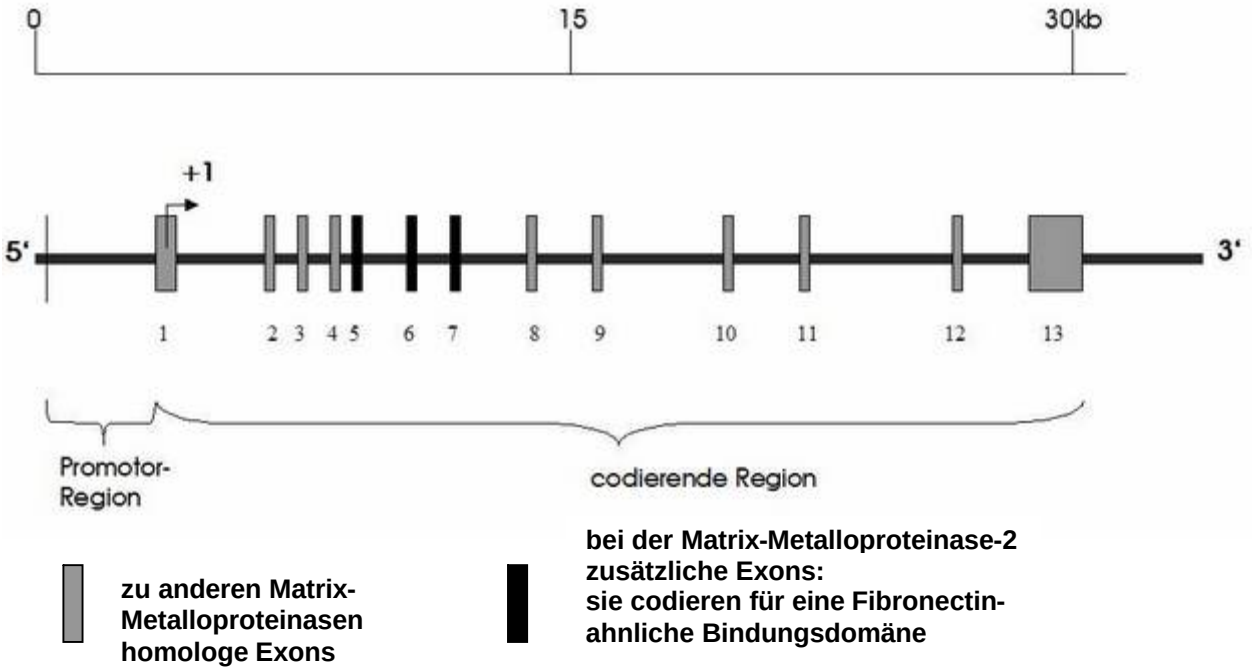


Abbildung 4:Genstruktur der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2)

(*modifiziert nach* Huhtala, Chow et al. 1990)

Die Exons sind als Rechtecke dargestellt. Die dunkelgraue Linie entspricht den Intronsequenzen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen und durch Anfärben bestimmter fibrillärer Proteine der ECM mittels Immunfluoreszenz fiel ein Faserverlust im Interzellularraum bei HFF-Zellkulturen infolge einer HCMV-Infektion auf.

Es stellte sich dabei die Frage, ob dieser Verlust an Fasern eher auf einer verringerten Synthese von fibrillären Proteinen basiert, oder ob es durch eine HCMV-Infektion in den Wirtzellen zu einer verstärkten Expression von die ECM abbauenden Enzymen den sog. MMP's kommt, welche zu einer verstärkten Degradation der ECM führt.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die MMP-2, als wichtiger Vertreter dieser Enzyme, eine Rolle in der Degradation der die Zellen umgebenden ECM nach HCMV-Infektion spielt. Die vorangehenden Untersuchungen von ECM-Proteinen nach einer HCMV-Infektion zeigten zum Teil entgegengesetzte Regulationsmodi – so zum Beispiel war beobachtet worden, dass viele Proteine auf Promotor-Ebene stimuliert, wohingegen sie auf m-RNA-Ebene eine verminderte Transkriptionsrate nach HCMV-Infektion aufwiesen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Regulation der MMP-2 nach HCMV-Infektion auf Promotor-Ebene, auf der Ebene der Transkription sowie auf der Ebene des aktiven Enzyms untersucht. Wegen der guten Kultivierungseigenschaften und angesichts der Tatsache, dass sich die Zellen einfach mit HCMV infizieren lassen, wurden die Untersuchungen analog zu den Voruntersuchungen auch am Beispiel einer HFF-Zellkultur durchgeführt.

3. Material und Methodik

3.1 Chemikalien, Enzyme bzw. Proteine, Nukleotide, häufig verwendete Lösungen und andere Verbrauchsmaterialen

Die Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p.A. und wurden, wenn im in diesem Abschnitt nicht gesondert aufgeführt, von folgenden Firmen bezogen:
Boehringer, Mannheim; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma; München

Antibiotika:

Ampicillin	Serva, Heidelberg
Penicillin	Serva, Heidelberg
Streptomycin(-Sulfat)	Serva, Heidelberg

Enzyme:

DNase I (RNase frei)	Boehringer, Mannheim
Klenow Polymerase	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	USB, Cleveland, USA
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Reverse Transkriptase	Gibco, BRL, Bethesda, MA, USA
RNAse A	Boehringer Mannheim
RNase Inhibitor – RNA-Guard	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Taq-Polymerase	Amersham, Braunschweig
T4-DNS-Ligase	Boehringer, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Seromed, Berlin

Aminosäuren und Proteine:

L-Glutamin (für Medien)	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt

Nukleotide und Nukleinsäuren:

Salmon-Sperm-(SSS-)DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Nukleotidtriphophate	Boehringer, Mannheim
dNTP-Mix (1 mM dTTP, 1 mM dGTP, 100 µM dATP, 100 µM dCTP)	Pharmacia, Uppsala, Schweden

Radiochemikalien:

α-[32P]-ATP	Universität Ulm

Chemikalien:

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Acrylamid-Lösung (30%) - (Rotiphorese Gel A)	Roth, Karlsruhe
Bisacrylamid-Lösung (2%) - (Rotiphorese Gel B)	Roth, Karlsruhe
Agarose Typ I	Sigma, München
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Aqua bidest.	eigene Herstellung Universität Ulm
Bacto-Agar, Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
$CaCl_2$	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagen Type III c-3511	Sigma, München
Coomassie-Blue G250	Roche Molecular Biochemics, München
DEAE-Dextran (MW 500.000)	Sigma, München
Dextranblau	Merck, Darmstadt
Dextransulfat	Boehringer, Mannheim
Dimethylformamid	Sigma, München
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer,Mannheim
EDTA	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll	Pharmacia, Uppsala, Schweden

First-Strand-Puffer	Gibco/BRL, NY, USA
Formamid	Boehringer, Mannheim
Glycerol	Boehringer, Mannheim
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Boehringer, Mannheim
IPTG	Boehringer, Mannheim
KCl	Boehringer, Mannheim
Methanol	Gibco/BRL, NY, USA
$MgCl_2$	Boehringer, Mannheim
MOPS (3-(N-Morpholiono)propansulfansäure)	Boehringer, Mannheim
Natriumacetat	Boehringer, Mannheim
NaCl	Boehringer, Mannheim
Na_2HPO_4	Boehringer, Mannheim
NaOH (2,5M)	Boehringer, Mannheim
10x-PCR-Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phenol	Gibco/BRL, NY, USA
Phosphonoessigsäure (PAA)	Sigma, München
RNase-freies Wasser	USB, Cleveland, USA
SDS (Dodecylsulfat-Na-Salz)	Serva, Heidelberg
Sephadex G50	Pharmacia, Uppsala, Schweden
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Serva, Heidelberg
Trinatriumcitrat	Boehringer, Mannheim
Tris (Tris-hydroxymethylaminomethan)	Boehringer, Mannheim
Tris-HCl (Tris-hydroxymethylaminomethan-hydrochlorid)	Boehringer, Mannheim
Trypanblau	Sigma, München
Triton-X100	Serva, Heidelberg
Tris-HCl (Tris-hydroxymethyhydrochlorid)	Merck, Darmstadt
Trockenmilchpulver	Uelzena, Uelzen
Tween 20	Merck, Darmstadt

X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galactosid)	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Zellkulturmedien und Zusätze:

Minimal essential medium nach Eagle (MEM)	Gibco/BRL, NY, USA
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco/BRL, NY, USA
FCS („fetal calf serum")	Gibco/BRL, NY, USA
MEM ALPHA MEDIUM	Gibco/BRL, NY, USA

Sonstige Verbrauchsmaterialen:

Collagen Typ III (c3511)	Sigma, München
DNA-Labelling and Detection Kit	Boehringer, Mannheim
Dual-Luciferase-Reporter-System	Promega, Mannheim
Gene Clean Kit	Dianova, Hamburg
1 kb DNA-Leiter (Größenstandard für DNA – Gel-Elektrophorese)	Gibco/BRL, NY, USA
kDa Protein-Leiter (Größenstandard für Zymographie) - Prestained SDS-PAGE Standards (High Range)	BIORAD, München
JET STAR KIT	Genomed, Raleigh, NY, USA
Multiprime-DNS-labelling-System	Amersham Buchler, Braunschweig
Poinceau-Rot (zum Färben von Western-Blots)	Sigma, München
QUIAquik Gel-Extraction-Kit	Quiagen, Hilden
Rneasy – Midi-Kit	Quiagen, Hilden
Sterilfilter	Millipore, Nalgene
Sure Clone Ligation Kit	Pharmacia, Uppsala, Schweden
TSR-Puffer	Applied Systems, Weiterstadt
Whatman Filterpapier	3M Whatman, Maidstone, GB

Zellkulturplatten	Costar, Cambridge, USA Greiner, Nürtingen NUNC GmbH, Wiesbaden
Zymographie-Proben-Puffer (Zymogram Sample Buffer)	BIORAD, München
Zymographie-Renaturations-Puffer (Zymogram Renaturation Buffer)	BIORAD, München
Zymographie-Entwicklungs-Puffer (Zymogram Development Buffer)	BIORAD, München

eingesetzte c-DNA-Sonden, Primer, Restriktionsenzyme und Plasmide:

c-DNA-Sonden bzw. zu deren Herstellung verwendete Primer:

die GAPDH-c-DNA-Sonde wurde freundlicherweise von H. Wilts (Ulm) zur Verfügung gestellt.

Primer:

die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert

zur Herstellung der MMP-2-c-DNA-Sonde eingesetzte Primer:

+ 5’ ATG AAG CCC TGT TCA CCA TG-3’

- 5’ GCA TCA ATC TTT TCC GGG AG-3’

zur Herstellung des MMP-2-Promotor-Reporter-Genkonstrukt:

1p-Konstrukt: + 5’ AAA GGT ACC ACC AGA CAA GCC TGA ACT TG-3’

- 5’ CCA AGC TTA AGC CCC AGA TGC GCA GCC TCC-3’

1230p-Konstrukt: + 5’ AAG GTA CCT CTG ACC ATC TAT CAT TGT GG-3’

- 5’ CCA AGC TTA AGC CCC AGA TGC GCA GCC TCC-3’

Restriktionsenzyme:

Hind III; Eco I; Kpn I	Roche Molecular Biochemics, München
Plasmid pUC18	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England

Luciferase-Plasmid pGL3:

pGL3-Basic-Vector	Promega, Mannheim

eingesetzte Antikörper:

Anti-Human-Vimentin, AS-1, Ig G aus der Maus	Dako, Hamburg
Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelter Anti-Maus IgG-Antikörper aus der Ziege	Dako, Hamburg

häufig verwendete (Puffer-)Lösungen - sofern selbst hergestellt:

PBS- (phosphate buffered saline) Lösung pH 7,4:

5	mM	$MgCl_2$
9	mM	$CaCl_2$
136	mM	NaCl
2,6	mM	KCl
8	mM	Na_2HPO_4
1,5	mM	KH_2PO_4

PBS-EDTA (100ml-Ansatz 0,2%):

2ml	EDTA (1%)
98	ml 0,01 M PBS
100	ml Gesamtansatz

LB-Medium (für E. coli-Kultivierung):

10	g/l	Bacto Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
8	g/l	NaCl

TYP-Medium (für E. coli-Kultvierung):

16	g/l	Bacto Trypton
16	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
2,5	g/l	K_2HPO_4

50x-Denhardts:

1	%	Ficoll (type 400)
1	%	Polyvinylpyrrolidin
1	%	BSA

DEPC-Wasser (1l-Ansatz):

Es wurde jeweils 1l Aqua bidest. mit 1ml DEPC versetzt gut, diese Lösung dann bei 40° C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das DEPC-Wasser autoklaviert. Durch die Behandlung mit DEPC sollte erreicht werden, das Wasser RNAsen-frei zu bekommen. Durch das Erhitzen des DEPC-haltigen, jetzt RNAse-freien, Wassers beim Autoklavieren wurde das DEPC wieder „vernichtet".

Ampicillin-Lösung:

50mg/ml in Aqua ad injectabilia, Lagerung aliquotiert bei -20°C

IPTG-Lösung:

2 g IPTG (Isopropyl-D-1-thiogalactopyranosid) in 10ml Wasser gelöst, steril filtriert. Lagerung bei -20°C.

X-Gal-Lösung:

40 mg X-Gal in 2ml Dimethylformamid gelöst. Lagerung bei -20°C.

20x SSPE(1l-Ansatz):

105,2 g NaCl
14,2 g Na_2HPO_4
3,72 g EDTA

→ bis 1l mit Aqua bidest. auffüllen und autoklavieren

Northern-Blot:

20x MOPS-Puffer (250ml Ansatz):
20,9 g MOPS
200 ml DEPC-Wasser
ca.11 ml NaOH (2,5M) bis pH etwa 7,0
5 ml DEPC-EDTA –Wasser (0,5M; ph 8,0)

⟶ mit DEPC-Wasser auf 250ml auffüllen

20 x SSC –Lösung (1l-Ansatz, pH auf 7,0 eingestellt, mit DEPC behandelt und autoklaviert):
175,32 g NaCl
88,23 g Trinatriumcitrat

→ in 1l Wasser lösen, mit 1ml DEPC versetzen und autoklavieren

TBE-Puffer:
90 mM Tris-HCl
90 mM Borsäure
2 mM EDTA
→ in 1l Wasser lösen

RNA-Farbmarker (1 ml Ansatz in 2ml Eppendorf-Gefässe, bei –20°C aufbewahrt):
2,5 mg Bromphenolblau
2,5 mg Xylencyanol
250,0 mg Ficoll
1,0 ml DEPC-Wasser

RNA-Lade-Puffer (Ansatz für 2,82ml):
1,44 ml Formamid
0,16 ml 20x MOPS
0,5 ml Formaldehyd
0,36 ml DEPC-Wasser
0,2 ml Glycerol
0,16 ml RNA-Farbmarker

Prähybridisierungs-MIX für Northern-Blot (20ml – Ansatz):

10	ml	Formamid
5	ml	20 x SSPE
0,8	ml	50x Denhardts
1,0	ml	SDS (10%)
2,8	ml	DEPC-Wasser
0,4	ml	Lachssperma-(SSS-)DNA

→ wurde zuvor bei 95°C denaturiert, dann für ca. 1min auf Eis gestellt

Hybridisierungs-MIX für Northern-Blot (10ml-Ansatz):

5	ml	Formamid
2,5	ml	20 x SSPE
0,4	ml	50x Denhardts
0,1	ml	SDS (10%)
0,8	ml	Dextransulfat (50%)
1,0	ml	DEPC-Wasser
0,2	ml	Lachssperma-(SSS-)DNA

→ wurde zuvor bei 95°C denaturiert, dann für ca. 1min auf Eis gestellt

Transiente Expression und Luciferase-Assay:

2x HBS (=2x Hepes-buffered-saline - 100ml Ansatz, steril filtriert zu 10 ml Aliquots portioniert, Lagerung bei -20°C):

1,6	g	NaCl
0,074	g	KCl
0,027	g	Na_2HPO_4 x 2 H_2O
0,2	g	Dextrose
1,0	g	Hepes

→ in 90 ml Aqua bidest. aufgelöst, mit 0,5 M NaOH pH auf 7,05 eingestellt und auf Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt. Nach Steril-Filtration Aliquotierung zu je 10ml. Lagerung bei –20°C.

0,1 x TE – Puffer(200ml Ansatz, steril filtriert zu 10 ml Aliquots portioniert, Lagerung bei -20°C):

100ml	1	mM	Tris HCl - Lösung
100ml	0,1	mM	EDTA – Lösung

→ je 100 ml der Tris-EDTA- (TE-) Lösung steril filtriert und zu je 10ml Portionen aliquotiert, Lagerung bei 4°C.

Glycerolschock-Lösung (20 ml – Ansatz, steril filtriert, Lagerung bei Raumtemperatur):
= 15%iges Glycerol in 1xHBS

dazu 3ml Glycerol in 17 ml 1xHBS (2xHBS 1:1 mit Aqua bidest. verdünnt)geben

→ steril filtriert, Lagerung bei Raumtemperatur

Western-Blot:

Laufpuffer für Western-Blot:

25	mM	Tris-HCl pH 8,6
190	mM	Glycin
0,1	%	SDS

Blotting-Puffer für Western-Blot (→ 48 mM Tris; 39 mM Glycin; 1,3 mM SDS; 20% Methanol

5,8	g	Tris
2,9	g	Glycin
0,37	g	SDS
200	ml	Methanol

→ mit aqua bidest. auf 1l auffüllen – pH 9,2

TBS-Lösung (50 mM Tris –HCl; 150 mM NaCl; pH 9,6) für Western-Hybridisierungen:

6,06	g	Tris-HCl
8,77	g	NaCl

→ mit aqua bidest. auf 1l auffüllen, pH auf 9,6 einstellen

Block-Lösung für Western-Hybridisierungen:

Es wurde eine 1,5% Milchpulver – TBS-Lösung hergestellt. Hierzu wurden 4,5g Milchpulver in 300ml TBS gelöst.

3.2 Geräte

ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Beckman GP Tischzentrifuge	Beckman, München
Beckman L7-65 Ultrazentrifuge	Beckman, München
Beckmann J2-21 Zentrifuge	Beckman, München

„Bluecap“-Gefäße	Greiner, Nürtingen
Northern-Blot – GT-Memran	BIORAD, München
- Zeta Probe GT-Membran	
DNS-Synthesizer 318A	Applied Biosystems Instruments, Foster City, CA,USA
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Göttingen
Elektrophoreseapparaturen	Eigenkonstruktion, BFAV, Tübingen
Eppendorf-Gefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Thermostat u. Rüttler	Eppendorf, Hamburg
Gamma-Counter Cobra Autogamma	Packard Instruments Co., USA
Spannungsgeber für Gelelektrophorese	Pharmacia/LKB, Freiburg
Gilson Pipetten Gilson	Villies Le Bel, Frankreich
Diavert Invertmikroskop,	Zählmikroskop Leitz, Wetzlar
Brutschränke (CO_2-begasbar)	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge, Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
Luminometer	Sarstedt, Nürnbrecht
Luminometer-Röhrchen	Sarstedt, Nürnbrecht
Sterile Bank, Heraeus Lamin Air	Heraeus, Hanau
Ultraschallgerät	Bransonic Power, USA
UV-Transilluminator	Bachhofer, Reutlingen
Vakuumofen u. Speed Vac Konzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Wasserbäder	Köttermann, Hängsingen
Quarzküvetten	Hellma, Müllheim
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellkulturschaber	Sarstedt, Nürnbrecht
Northern-Blot – Blotting-Apparatur „Semi Dry Blotters“	BIORAD, München
Western-Blot - Blotting-Apparatur	BIORAD, München

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultur und Viren

3.3.1.1 Kultivierung von HFF-Zellen

In der Zellkultur wurden humane Vorhautfibroblasten (HFF,human foreskin fibroblasts) zwischen der 10. und 25. Passage verwendet. Das Kulturmedium wurde alle 7-10 Tage gewechselt.

Zur *Zellvermehrung* wurden konfluente Kulturen mit 0,1 M PBS-EDTA zweimal gewaschen und mit einer 1:1 Lösung aus 1x Trypsin und 0,1 M PBS-EDTA abgelöst. Sowohl das PBS-EDTA als auch das Trypsin waren zuvor im Wasserbad auf etwa 37°C erwärmt worden. Die vollständige Ablösung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann mit Kulturmedium auf 10ml verdünnt und auf drei neue, soweit nicht anders beschrieben, 75 cm^2 Kulturflaschen verteilt und auf 15-20ml mit Kulturmedium aufgefüllt. In diesem Verhältnis gesplittet, waren die Zellen nach 5-7 Tagen wieder zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen. Der erste Mediumwechsel wurde zur Entfernung der evtl. beim Ablöseprozess zugrundegegangenen Zellen schon nach 24h durchgeführt. Die weiteren dann wöchentlich.

3.3.1.2 Herstellung zellfreier Virusstocks

Zur *Herstellung der Virusstocks* wurden HFF-Kulturen mit dem HCMV - Laborstamm AD 169 (Gupta et al. 1977), infiziert und anschließend bei 37 °C inkubiert. Nach einer Woche wurden die infizierten mit nicht infizierten Zellen im Verhältnis 1:11 gemischt, dann weiter inkubiert. Zur Virusernte wurde ab dem 5. Tag nach dieser Prozedur 3 Tage lang täglich das Medium abgenommen und für 15 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Ins Medium abgeschwommene Zellen wurden dadurch pelletiert. Das im Überstand enthaltene Virus hatte man dann durch erneute Zentrifugation für 1h bei 2000 rpm und 4 °C in einer Ultrazentrifuge pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Viruspellet in einer Lösung aus Kulturmedium und Sucrosephosphatpuffer (Kulturmedium : Sucrosephosphatpuffer = 1 : 1) aufgenommen, aliquotiert und bei –70°C eingefroren.

3.2.1.3 Virustiterbestimmung

Zur Titerbestimmung wurden 2 x 10^6 HFF auf einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät und am nächsten Tag mit Virus aus eben diesem Virusstock in verschiedener Verdünnungsstufe (von1:10 bis 1:10 000 000, je viermal - Vierfachbestimmung) infiziert. Es wurden hierfür jeweils 100µl Infektionslösung (bei Verdünnungsstufe 1:10 z.B. also 10µl Virusstocklösung. + 90µl Kulturmedium) pro Well eingesetzt. Infizierte Zellen wurden nach 24h durch den Nachweis der IE-Protein-Expression detektiert.

Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 10 min bei - 20°C mit eiskaltem Methanol fixiert. Nach Trocknung der Kultur wurde dreimal mit 0,01 M PBS gewaschen und für 30 min mit dem IE-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Auswaschen nicht gebundener IE-Antikörper wurde wieder dreimal mit 0,01 M PBS gewaschen. Danach wurde die Kultur nochmals 30 min bei RT mit einem Meerrettichperoxidase (POD) gekoppelten Anti-Maus IgG-Antikörper aus der Ziege inkubiert. Wieder wurden die nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 0,01 M PBS entfernt. Als Substrat für die Peroxidase-Reaktion Diaminobenzidin (DAB: 0,5 mg/ml in 0,1 M PBS / 10 % Methanol, Umsetzung durch 0,004% H_2O_2) oder 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC: 1 Tablette in 4 ml N-N-Dimethylformamid lösen, in 16 ml 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 5 geben, Umsetzung durch 1 µl H_2O_2) benutzt. Bei infizierten Zellen färbten sich hierbei deren Kerne rotbraun an. Durch Auszählung der Kerne wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe der Titer des Virusstocks bestimmt.

3.2.1.4 Virusinaktivierung

Da wie schon erwähnt auch inaktivierte, d.h. nicht mehr vermehrungsfähige Viren durch ihren alleinigen Kontakt mit der Wirtszelle deren Stoffwechselvorgänge beeinflussen können, wurden zum Vergleich auch Experimente mit inaktivierten Viren durchgeführt. Die Inaktivierung geschah mittels UV-Bestrahlung (Wellenlänge 366 nm). Hierzu wurde die erforderliche Menge Virus in einem Volumen von 500µl aufgenommen, dieses in eine Petrischale überführt und (bei geöffnetem Deckel!) 2min bei 200µJ bestrahlt. Am Ausbleiben des zytopathischen Effektes in den mit diesem Virus behandelten Zellkulturen war der der Erfolg der Inaktivierung ersichtlich.

3.2.1.5 Infektion von HFF's

Etwa 1-2 Tage vor geplanter Infektion wurden die Zellen auf Wells oder Schalen ausgesät. Um größere Schwankungen der Zellzahl zu vermeiden, wurden die Zellen vor Aussaat in der Neubauer-Zählkammer gezählt und dann die entsprechend der Fläche der jeweiligen Wells benötigte Menge ausgesät.

Bei ca. 90%-iger Konfluenz, also nach ein oder zwei Tagen, wurde mit der gewünschten Multiplicty of Infection (MOI) infiziert. Weil man in den Experimenten den Effekt der eigentlichen Infektion von Begleiteffekten, die der Vorgang der Infektion mit sich bringt(Mediumwechsel, Waschungen, Kontakt der Zellen mit Fremdprotein der Viren) trennen wollte, infizierte man als Kontrolle die Zellen mit Mock-Lösung (Kultur-Medium + Sucrosephosphatpuffer im Verhältnis 1:1→ entspricht Virusstocklösung.) bzw. mit inaktivierten Viren. Nach Zugabe der jeweiligen Infektionslösungen und Inkubation für etwa eine Stunde bei 37 °C(Ausnahme: Transiente Expression siehe dort) wurde 2x 15 min bei 800 x g zentrifugiert, was die Infektionseffizienz um den Faktor 5-20 steigern sollte.

3.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden abtrypsiniert und nach Anfärben mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop die vitalen (blau-angefärbten Zellen) gezählt. Nach Abtrypsinieren der Zellen durch Zugabe PBS + Trypsin im Verhältnis 1:1 und kurze Inkubation bei 37° wurden die Zellen durch Hinzufügen einer geeigneten Menge an Medium in Suspension gebracht. Die *Gesamtmenge* (in ml) der Suspension wurde vermerkt. Nun wurden 20 µl der Suspension mit 20 µl Trypan-Blau-Lösung gemischt und davon eine Portion in die Neubauer-Zählkammer gegeben.
Man zählte die Zellen quadrantenweise aus, summierte diese und rechnete wiederum den Durchschnitt aus. Da man eine 1:1 Verdünnung Trypan-Blau – Zellsuspension hergestellt hatte musste man diesen Wert nochmal mit 2 multiplizieren.
Der sich daraus ergebende Wert Y entsprach der Konzentration der Zellen Y x 10^4/ml.
Eine Suspension mit z.B. 10 ml *Gesamtmenge* enthielt also Y x 10^5 Zellen, bzw. Y/10 x 10^6 Zellen.

3.3.2 Molekularbiologie

3.3.2.1 RNA-Extraktion und –Quantifizierung

Um eine Kontamination mit RNAsen möglichst zu vermeiden wurde grundsätzlich nur an einem vorher mit Desinfektionslösung abgewischten Arbeitsplatz gearbeitet. Darüber hinaus wurde nur mit Handschuhen gearbeitet sowie RNAse-freie Materialen und Lösungen verwendet.
Sofern nicht anders beschrieben wurde sog. DEPC-Wasser (s. häufig verwendete Lösungen 3.1) benutzt.

In der Zellkultur wurden hierzu HFF – Zellen in 10-cm Schalen kultiviert.

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus den kultivierten HFF's erfolgte mit dem Kit „Rneasy ^{TM} Midi" von Qiagen gemäß mitgeliefertem Protokoll.

Dazu wurden jeweils aus den Zellen zweier 10-cm Schalen gleichen Ansatzes (also z.B. mock 24h) extrahierte Gesamt-RNA in 300 µl RNAse-freiem Wasser aufgenommen und anschließend aliquotiert. Zur Qualitätskontrolle brachte man je 1µl (pro gleichen Ansatz also je 1µl m24, ia 24, i 24) auf ein 1 % Agarose-Gel. Nach dem Gel-Lauf ca. 30 min, 120 V und Nachfärben mit Ethidiumbromid wurden unter Durchleuchtung mit UV-Licht die drei Banden zellulärer RNA sichtbar (s.Abbildung 5.)

Die RNA-Menge wurde mithilfe der OD-Methode photometrisch bestimmt (s.3.3.2.16)

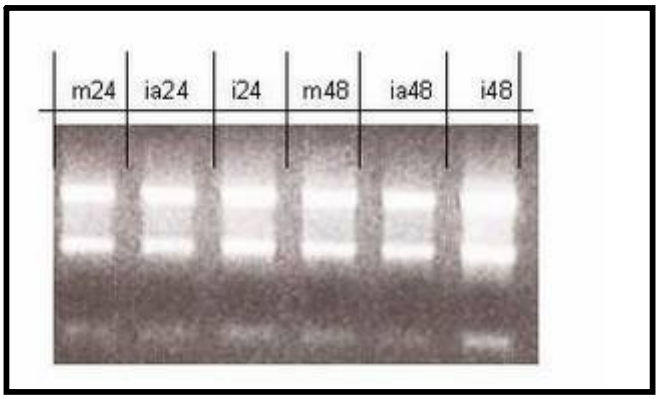


Abbildung 5: RNA-Banden

Das Gelphoto zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA aus HFF-Zellkulturen, welche entweder mit m=Mock-Lösung, mit ia=UV-inaktivierten Viren oder mit i= dem HCMV-Stamm AD 169 inokuliert wurden. Die Zellernte fand nach 24h und 48h statt (z.B. i24 = Inokulation mit infektiösem Virus Die jeweils unterste Bande entspricht den Geltaschen, die oberen beiden Banden entsprechen jeweils den 18- und 28-Svedberg-Banden ribosomaler RNA. Hätten sich weitere Banden dargestellt, so hätte dies auf eine Verunreinigung der RNA durch Degradation hingedeutet – die RNA hätte dann verworfen worden müssen.

3.3.2.2 Gewinnung genomischer DNA aus HFF-Zellen

Zur Durchführung der Transfektionsexperimente wurde genomische DNA aus HFF-Zellen gewonnen. Sie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Michel (Universität Ulm) zur Verfügung gestellt und wurde nach üblichen Protokollen gewonnen.

Präparation genomischer DNA aus Suspensions-Zellen (Aussalzmethode)

2-6x$(10)^6$ Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden 200 µl 5x Lysis-Puffer, 50 µl 20x SDS und 10 µl Proteinase K (10mg/ml) gegeben und zunächst für 30 min bei 65 °C und im Anschluss über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden 400 µl 5 M NaCl hinzugefügt, 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Nach der Zugabe von 5 ml absoluten Ethanols wurde die präzipitierte DNA für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA 3x mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wird in 50 µl H_2O aufgenommen und mit RNase A (0,1 mg/ml) für 1 h bei 37 °C behandelt.
Die Auftrennung der genomischen DNA erfolgte in einem 1,4 %-igen Agarose-Gel.

3.3.2.3 RT-PCR zur Amplifikation von RNA-Sequenzen im Rahmen der Herstellung der Northern-Blot-Sonde

3.3.2.3.1 Protokoll RT-Reaktion

7µl	3 µl	5x First Strand RT-Puffer
	1 µl	0,1 M DTT
	1 µl	dNTP (200µM)
	1 µl	spez. MMP-2 Primer (-)
	1 µl	RNA-Guard
	x* µl	Gesamt-RNA aus HFF
	(15-7-x) µl	RNAse-freies Wasser
	15 µl	Reaktionsvolumen

Dieser Ansatz wurde zunächst bei 5min bei Raumtemperatur inkubiert, danach fügte man1 µl Reverse Transkriptase hinzu. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C für 60 min wurde der Ansatz für 5 min auf 95 °C erhitzt und sofort danach für etwa 3 min auf Eis gestellt. Schließlich wurde kurz abzentrifugiert (1min, 13000 rpm).

Die bei dieser Reaktion entstandene c-DNA wurde mittels PCR nach unten stehendem Protokoll (3.3.2.3.2) amplifiziert.

3.3.2.3.2. Protokoll PCR – Reaktion

28,5 µl	RNAse-freies Wasser
5 µl	10x Puffer
5 µl	dNTP
2,5 µl	(+) - Primer
2,5 µl	(-) - Primer
1 µl	Tween 20
0,5 µl	Taq- Polymerase
5 µl	c-DNA aus RT-Reaktion (s.3.3.2.3.1)
50 µl	Reaktionsvolumen

Als Produkt aus dieser RT-PCR haben wir einen Teil der gewünschten Sequenz in hoher Kopienzahl erhalten.

3.3.2.4 Touchdown-PCR zur Amplifikation von DNA-Sequenzen im Rahmen der Herstellung geeigneter Plasmide für Transfektionsexperimente

Diese wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

28,3 µl	RNAse-freies Wasser
5 µl	10x Puffer
5 µl	dNTP
2,5 µl	(-) - Primer (1p/1230p →s. Material)
2,5 µl	(+) - Primer (für 1p/1230p identisch →s. Material)
1 µl	Tween 20
0,7 µl	Taq- Polymerase
5 µl	genomische DNA aus HFF(4.3.2.2)
50 µl	Reaktionsvolumen

3.3.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren

3.3.2.5.1 Klonierungen für Northern-Blot-Sonde:

Das durch die RT-PCR (3.3.2.3) gewonnene Fragmente der MMP-2 wurden in pUC 18 einkloniert. Die Klonierung wurde mit dem Sure-Clone-Kit von Pharmacia nach dessen Anleitung durchgeführt.

3.3.2.5.2 Klonierungen für Promotor-Reportergen-Konstrukt:

Die Fragmente 1p und 1230p wurden hierbei nach folgendem Protokoll in das pGL-3-Enhancer einkloniert:

a) Schneiden der Fragmente 1p, 1230p und des Plasmids pGL 3:
Es wurde mit Kpn I und Hind III in zwei zeitlich getrennten Ansätzen geschnitten.
Die für den 1. Restriktionsansatz mit Kpn I eingesetzte DNA-Menge der Fragmente 1p + 1230p bzw. betrug in etwa 5µg. Nach Aufnahme der Fragmente bzw. des Plasmids in der entsprechenden Menge PCR-Wasser fügte man den jeweiligen Reaktionspuffer sowie die Restriktionsenzyme hinzu.
Zunächst wurde mit Kpn I geschnitten (Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 100µl.) Die Restriktionsprodukte daraus wurden ethanolgefällt (s.3.3.2.12), die getrockneten Pellets in 18 µl PCR-Wasser aufgenommen und für den 2.Schneideansatz mit Hind III verwendet. Nach dieser 2. Restriktion und erneuter Ethanolfällung, nahm man die getrockneten Pellets diesmal in 20 µl PCR-Wasser auf. Die so erhaltenen, je mit Kpn I und Hind III geschnittenen Fragmente und das Plasmid pGL3 verwendete man für die Ligation.
Die jeweiligen Ansätze wurden 60min bei 37 °C inkubiert

b) Ligation der Fragmente in pGL3:

Die mit Hind III und Kpn I geschnittenen Fragmente 1p und 1230p werden nun jeweils nach folgendem Ansatz in das ebenso mit diesen Restriktionsenzymen geschnittene und damit eröffnete pGL3-Plasmid ligiert.

10 µl des jeweiligen Fragments wurden hierzu mit je 2 µl des pGL3-Plasmids, 1µl Ligase sowie 2 µl Ligasepuffer versetzt. Die Ansätze wurden dann bei 15-16° über Nacht inkubiert.

3.3.2.6 Herstellung transfektionskompetenter Bakterien

Durch verschiedene Verfahren kann die spontane Aufnahme von Fremd-DNA in die Bakterien erheblich gesteigert werden. In unserem Fall wurde dies durch die Behandlung der E.coli-Bakterien mit eiskalter Calciumchlorid-Lösung erreicht (Sambrook J. et al. 1989).

2 ml einer frischen 10 ml Übernachtkultur wurden in 100 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C im Schüttler so lange inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD_{600} von 0,3 erreicht hatte (nach etwa 90 min). Zur Sedimentation wurde 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands resuspendierte man das Pellet in 50 ml eiskalter 0,1 M $MgCl_2$-Lösung. Nun wurde erneut durch Zentrifugation (3000 rpm, 5 min) sedimentiert und anschließend das entstandene Pellet in 1 ml eiskalter 50 nM $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde zu je 200 µl Portionen aliquotiert und bei - 70°C gelagert.

3.3.2.7 Transformation kompetenter Zellen

Es wurde jeweils ein 200 µl Aliquot transfektionskompetenter E.coli (s.3.3.2.6) schonend auf Eis aufgetaut. Man fügte 100-150 ng Plasmid-DNA und inkubierte 20 min auf Eis. Nach dem anschließendem Hitzeschock (2min, 42 °C) und Zugabe von 800 µl LB-Medium wurde 20 min bei 37°C inkubiert, dann bei 3000 rpm etwa 1min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Restüberstand gelöst. Die so transformierte Bakterienkultur wurde auf LB-Agar-Platten (1,5 %-ig und zur

Selektion Ampicillin, IPTG und X-gal enthaltend) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet. Die Kolonien, welche das gewünschte Plasmid (+Insert) trugen, wuchsen in weißer Farbe.

3.3.2.8 Plasmidvermehrung und Extraktion im analytischen Maßstab (Mini-Präp)

Die weißen Kolonien aus der über Nacht bebrüteten Bakterienkultur (3.3.2.7) wurden in Form von Einzelkolonien mit Zahnstochern gepickt und mindestens 5h bei 37 °C in 1,5ml TYP-Medium bzw. über Nacht in LB-Medium (jeweils mit Ampicillin versetzt) im Bakterienschüttler inkubiert.

Um nachzuprüfen, ob und welche Bakterienkolonien nach der zuvor durchgeführten Transformation das gewünschte Plasmid enthalten, wurde eine Schnellpräparation der Plasmid-DNA, die sog. Mini-Präp durchgeführt.

Hierzu wurden etwa 1-1,5ml aus dem in den Black-Caps über Nacht bebrüteten Ansatz der transformierten (s. 3.3.2.7) Einzelkolonien je in ein 1,5ml - Eppendorf-Gefäß überführt (der in den Black-Caps verbliebene kleine Rest, wurde im Kühlschrank verwahrt, man konnte ihn so für die *Maxi-Präp* (s. 3.3.2.9) verwenden). Diese Eppendorf-Gefäße wurden für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen, das Pellet vorsichtig getrocknet. Zur Resuspension wurde das Pellet in 100 µl eiskalter Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA) aufgenommen und die Eppendorfen-Gefässe ca. 30 sec geschüttelt bis der Inhalt homogen erschien. Danach wurden sie sofort wieder auf Eis gebracht und dort für 5 min inkubiert.

Zur alkalischen Lyse versetzte man den jetzt den Ansatz mit 200 µl Lösung 2 (1% SDS, 0,2 M NaOH), schüttelte erneut und inkubierte anschließend 1 min bei RT. Schließlich wurde durch Zugabe von Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure), 1-minütiges Mischen auf dem Schüttler, 5-minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (5min, 10000 rpm) die Proteinfällung durchgeführt.

Durch dieses Procedere kommt es zur Abscheidung denaturierter Proteine und chromosomaler DNA im Pellet. Im Überstand befindet sich dann die Plasmid-DNA in gelöster Form. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Nach

Zugabe von 100% Ethanol und Inkubation der Ansätze bei –20°C für 10 min wurde die darin enthaltene Plasmid-DNA gefällt und dann durch Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes nahm man das gut getrocknete Pellet je nach Menge in 50 µl oder 100 µl H_2O (Aqua bidest. ö.ä.) auf.

Zuletzt wurde mit 6 µl dieser Lösung und den jeweils geeigneten Restriktionsenzymen nochmals ein Restriktionsverdau (s. 3.3.2.10) durchgeführt, wodurch das jetzt vervielfältigte Fragment aus dem Plasmid geschnitten werden sollte. Durch Auftragen des Ansatzes nach Restriktion auf ein 1% Agarosegel (s.3.3.2.14) konnte die Identität des Fragments anhand der Größe so nochmals kontrolliert werden.

3.3.2.9 Plasmidvermehrung und Extraktion im präparativen Maßstab (Maxi-Präp)

Nachdem dem man durch die zuvor durchgeführte Mini-Präp, die gewünschten Klone identifiziert hatte, vermehrte und extrahierte man diese durch die sog. Maxi-Präp. Hierzu wurde ein Teil des Restes aus den Black-Caps des Mini-Ansatzes, der sicher das gewünschte Fragment im Plasmid enthielt (s.3.3.2.8) zum Animpfen der Maxi-Kulturen verwandt: Um die Kontamination durch Fremdkeime gering zu halten, wurde an der Brennerflamme gearbeitet. Nach Abflammen des Öffnungsrandes, wurde 100 ml TYP-Medium in einen Erlenmeyerkolben gegeben.

Man fügte noch 100 µl Ampicillin-Lösung. zu mit dem Ziel, eine Vermehrung nur der Bakterien-Klone zu erreichen, welche außer dem gewünschten Fragment ja auch noch ein Ampicillin-Resistenz-Gen besitzen sollten. Zuletzt wurden 10 µl der Mini-Kultur zugefügt (s.3.3.2.8). Zur kulturellen Vermehrung der sog. Maxi-Kultur folgte eine Inkubation für ca. 12-16 Stunden bei 37° in einem Schüttelinkubator.

Nach dieser Zeit verteilte man die 100ml Bakterienkultur auf zwei Blue-Caps zu je 50 ml. Diese wurden dann in einer großen Zentrifuge bei 4°C und 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das die Bakterienklone enthaltende Pellet wurde zur weiteren Aufbereitung verwandt. Zur Plasmidisolierung wurde der JET STAR KIT von Genomed eingesetzt, wobei nach dessen Anleitung vorgegangen wurde.

Am Ende dieser Prozedur erhielt man nach Präzipitation und Waschen die Plasmid-DNA als Pellet in Form eines weißen Ringes am Boden des 50 ml Blue-Caps. Nach vorsichtigem Ableeren des Überstandes wurde das Pellet ausgiebig getrocknet, das Ethanol sollte vollständig verdunstet sein. Schließlich löste man das Pellet in 100 µl H_2O und überführte die Lösung es in ein kleines 1,5ml Eppendorf-Gefäß. Gelagert wurde die Lösung bei 20°C. Die Konzentration der Plasmid-DNA in der erhaltenen Lösung wurde nach der OD-Methode ermittelt (s 3.3.2.16).

3.3.2.10 allgemeiner Ansatz zum Restriktionsverdau (Northern-Sonden- c-DNA)

6	µl DNA-Lösung. (Plasmid mit Fragment-Insert)
0,5	µl Restriktionsenzym 1
0,5	µl Restriktionsenzym 2
1	µl Puffer
2	µl H_2O
10µl	Restriktionsansatz

Inkubation des Restriktionsansatzes für 20-30 min bei 37°C, dann Zugabe von 5 µl RNAse (Verdünnung 1:500), nochmalige Inkubation für 10 min bei 37°C.

Nach Zufügen von 2 µl Farbmarker, Aufbringen auf Agarose-Gel (s.3.3.2.13) zur Überprüfung der Fragmentidentität anhand der Größe.

3.3.2.11 Anlegen von Glycerinkulturen

Um die zur Plasmidvermehrung gezüchteten E. coli auch längerfristig aufbewahren und später wieder in Kultur nehmen zu können, wurden von diesen Glycerinkulturen nach folgendem Schema angelegt:

Aus der Bakteriensuspension des Maxi-Kultur-Ansatzes (s.3.3.2.9) wurden vor Zentrifugation 1ml abgenommen und in ein kleines (1,5ml) Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 3000 rpm, RT) und Abgießen des Überstandes, blieb ein Pellet aus den plasmid-tragenden Bakterien zurück. Zu diesem Pellet gab man eine vorher in einem separatem Eppendorf-Gefäß vorbereitete Mischung aus 500 µl TYP- oder LB-Medium und 100% Glycerol. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde dann das Pellet resuspendiert. Die so erhaltene Glycerin-Kultur wurde dann bei -20°C aufbewahrt.

3.3.2.12 Ethanolfällungen

a) bei Klonierungen

Tabelle 1: Restriktionsansatz für Klonierungen

	Ansatz für 100 µl Restriktionsprodukt (Fragmente 1p, 1230p nach 1.Restriktion):		*Ansatz für 20 µl Restriktionsprodukt (Plasmid pGL3, Fragmente 1p, 1230p nach 2. Restriktion):*
Plasmid/ Fragment (1p/1230p)	100 µl		20 µl
Natrium-Acetat 3M	10 µl		2 µl
Ethanol (100%)	300 µl		60 µl

- Mischen durch mehrmaliges Invertieren
- mind. 1h bei –20°C einfrieren
- Zentrifugation 13000 rpm, 10 min
- Überstand verwerfen
- Zufügen von Ethanol 70 %
- Mischen durch Invertieren
- Zentrifugation 13000 rpm, 5 min
- Pellet gut trocknen

Da es sich bei dem Produkt aus der Ethanolfällung um hochreine DNA handelte, war das Pellet kaum oder gar nicht sichtbar! Das trockene Pellet wurde dann in 20 µl PCR–Wasser aufgenommen und für die Ligation verwendet. Eine Lagerung der Restriktionsprodukte war bei –20°C möglich.

b) nach PCR

Nach der Vervielfältigung von DNA mittels PCR wurde zur späteren Sequenzierung eine Ethanolfällung Reinigung und Ankonzentrierung der entstandenen DNA-Kopien durchgeführt.

Zu den 20µl des PCR-Amplifikates wurden 80µl mit Blue-Dextran versetztes Wasser hinzupipettiert. Nun wurde der gesamte Inhalt des PCR-Proben-Gefäßes in ein 0,6ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 10 µl Natrium-Acetat (3M, pH 4,6) und 250µl Ethanol (100%) wurde die Probe für 10 min bei RT stehen gelassen. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 20min bei 13000 rpm bei RT. Am Ende sollte sich die amplifizierte DNA als Pellet bzw. Ring am Boden des Eppendorf-Gefäßes abgeschieden haben. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, wobei ein kleiner Tropfen als Rest verbleiben durfte. Zu diesem Rest gab man erneut 250 µl Ethanol (70%) und zentrifugierte nochmals für 5 min bei 13000 rpm und RT. Um ein möglichst reines Pellet ohne Ethanol-Reste zu erhalten, sollte der Überstand diesmal restlos verworfen werden, hierzu wurden das Ethanol vorsichtig mit der Pipettenspitze abgenommen und das Pellet gründlich getrocknet. Das trockene Pellet konnte jetzt bei –20°C aufbewahrt oder zur Sequenzierung (s. 3.3.2.13) sofort in 20 µl TSR-Puffer aufgenommen werden.

3.3.2.13 DNA – Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden, soweit nicht anders beschrieben, 1 µg Plasmid – DNA (in TSR-Puffer gelöst)eingesetzt. Die Menge der hierzu benötigten Plasmid-DNA in µl wurde berechnet.

Beispiel: Um 1µg DNA zu erhalten werden x - µl DNA-Lösung benötigt:

x = 1µg / Konzentration DNA-Lösung (µg/µl)

Da jeweils von beiden Enden her sequenzierte wurde, wurde pro Plasmid-DNA zwei Proben, eine (A) mit *Universal(UP)*-, die andere (B) mit *Reverse-Primer (RP)*, angesetzt. Insgesamt sollte man ein Reaktionsvolumen von 20µl erhalten.

Der Sequenzierungs-Ansatz wurde nach Anleitung des ABI-Prism™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kits in PCR-Eppendorf-Gefäße bereitet und sah wie folgt aus:

Tabelle 2: Sequenzierungsansatz

UP = Universal-Primer RP = Reverse-Primer

	A	B
PCR-Wasser	(14 – *x*)µl	(14 – *x*)µl
Plasmid-DNA	*X* µl	*x* µl
Sequenzer-Mix(Big Dye®)	4 µl	4 µl
Primer (Universal/Reverse Primer)	2µl (*UP*)	2 µl (*RP*)
Reaktionsvolumen	20 µl	20 µl

Die Proben wurden zur PCR in den Thermocycler gestellt

Die eigentliche Sequenzierung der Proben wurde dann mit dem ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer von Perkin Elmer durchgeführt.

Die sich daraus ergebenden Sequenzen wurden mit denen für die jeweiligen Gene bekannten Nukleotidsequenzen verglichen. Folgende, im Internet vorhandene, Datenbanken wurden zu diesen Sequenzvergleichen hinzugezogen: http://www.2.ebi.ac.uk/fasta3/ und http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi

3.3.2.14 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA zur Analyse und Präparation

Gelpräparation:

Normalerweise wurde ein 1%-iges Agarose Gel sowohl zur Analyse als auch zu präparativen Zwecken angefertigt, in dem man z.B. 1,5g Agarose-Pulver in 150ml 1xAGB – Pufferlösung durch mehrmaliges Aufkochen löste. Nach kurzer Abkühlung bis etwa Handwärme wurden ca. 8-10 µl Ethidiumbromid der Lösung zugesetzt(Verhältnis Ethidiumbromid:Agarose-Lösung etwa 1:20000) und diese dann in die Gelkammer gegossen. Diente das Gel analytischen Zwecken, so wurde ein Kamm, der schmale Taschen ergab, ergab verwendet. Bei einem der anschließenden Präparation dienenden Gel wählte man einen Kamm der breite Taschen ergab. Schließlich wurde das erkaltete Gel mit 1xAGB-Puffer Lösung überschichtet, so dass der Puffer das Gel um mindestens ein paar Millimeter überragte.

Probenauftragung und Gel-Lauf:

Die jeweiligen Proben wurden mit Farbmarker (Verhältnis Farbmarker: Probe ca. 1:10) versetzt und in die Taschen pipettiert. Für analytische Zwecke setzte man dazu ungefähr je 5-10µl Probe und 1-2µl Farbmarker ein. Für präparative Zwecke nahm man etwa 40-45µl Probe und 5-10µl Farbmarker. Zur Größenabschätzung wurde jeweils am Rand zusätzlich ein Leiter (1kb-Leiter) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150-200 V. Anschließend wurde das Ergebnis der Auftrennung durch Abfotografieren des Geles über einer UV-Lampe dokumentiert.

3.3.2.15 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung (s. 3.3.2.14) auf einem präparativen Gel wurden die unter UV-Licht sichtbaren, erwünschten Banden mit dem Skalpell

ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte dann mit dem QUIAquick Gel-Extraction-Kit von Quiagen genau nach Anleitung.

Eine kleine Portion (1-5µl) des am Ende dieser Prozedur erhaltenen DNA-Extraktes wurde Reinheitskontrolle nochmals gel-elektrophoretisch (analytisch) aufgetrennt (s. 3.3.2.14). Durch Auftragung zweier definierter Mengen (z.B. 1µg und 3µg) der gleichen Probe ließ sich außerdem mittels Vergleich mit der Stärke der Leiter die Menge abschätzen. Als eine andere, etwas genauere Methode zur Bestimmung der DNA-Menge wurde die Extinktionsmessung am Photometer angewandt (s.3.3.2.16).

3.3.2.16 Bestimmung der DNA- / RNA-Konzentration mittels OD-Methode am Photometer:

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich durch Messung der optischen Dichte bei (OD) bei 260 nm ermitteln. Um so die Konzentration der DNA zu bestimmen, gab man 5 µl dieser Lösung zu 995 µl PCR - H_2O (Verdünnung 1:200) und maß die Extinktion bei 260 nm am Photometer. Der angezeigte Wert der Extinktion mit 10 multipliziert entspricht bei dieser Verdünnung relativ genau der DNA-Konzentration µg/ml – zum Beispiel: Extinktion 0,212 -> DNA-Konzentration 2,12 µg/µl.

Analog dazu erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration. Wegen des unterschiedlichen Extinktions-Koeffizienten wählte man hierbei eine Verdünnung von 3µl RNA auf 897µl PCR-Wasser. Die gemessene Extinktion musste man nun mit dem Faktor 12 multiplizieren um die Konzentration der RNA in µg/µl der Lösung zu erhalten.

3.3.2.17 Transiente Expression und Luciferase-Assay

Um die jeweiligen Plasmide, einerseits das die Inserts 1p bzw. 1230p enthaltende, andererseits das leere pGL3-Plasmid(→ im Folgenden kurz 1p-Luc,1230p-Luc und Luc-leer - Plasmid genannt), transient zu exprimieren gab man die Reaktionsansätze auf in 12 oder 24-Well-Platten gewachsene HFF's die je mit Mock-Lösung oder

infektiösen Viren „infiziert“ wurden (s. 3.2.1.5). Die Infektion fand dabei unmittelbar vor der transienten Expression statt.

Transient exprimiert wurden also die Vektor-Konstrukte *MMP-2-Promotor*-Firefly-Luciferase(1p-Luc sowie 1230p-Luc), *MMP-2-Promotorlose*-Firefly-Luciferase (Luc-leer)in jeweils verschiedenen Ansätzen und die *Kontroll-Promotor*-Renilla-Luciferase(renilla) in jedem Ansatz.

Für die transiente Expression stellte man in Blue-Caps für jedes Well separat die Reaktionsansätze her, welche später zur transienten Expression auf die Zellen gegeben wurden.

Der Reaktionsansatz zur transienten Expression für die 1p - Luc bzw. 1230p – Luc Plasmide enthielt je 125µl 2xHBS-Puffer und 105 µl 1xTE-Puffer, der für das leere pGL3-Plasmid (Luc-leer) je 125µl 2xHBS und 106µl 1xTE-Puffer. Von den Plasmiden selbst wurden im Falle von 1p und je 0,5 µg (→ entsprach je 5µl), vom leeren pGL3-Plasmid ebenfalls 0,5µg(→ entsprach 4µl) eingesetzt. Zusätzlich wurde jedem Reaktionsansatz 1µl (entsprach 500ng) Renilla zugesetzt. Nach Bereitung der Reaktionsansätze wurden diese kurz abzentrifugiert, dann je 16µl 2 M $CaCl_2$ unter Schütteln zugesetzt. Anschließend wurden die Ansätze bei RT 30min inkubiert. Dabei sollten sich Kristalle bilden – in diesem Milieu soll die Penetration der Plasmide in die Zelle erleichtert werden. Schließlich wurde den Reaktionsansätzen je 1,5 ml MEM-Medium beigefügt und durch auf- und abpipettieren mit diesen vermischt. Der gesamte Ansatz (→Reaktionsmedium) wurde nun nach Absaugung der Kulturüberstände auf die Wells verteilt. Es folgte eine Inkubationszeit von 3-4h in der die Plasmide in kristalloider Lösung sich an die Zellen anlagern sollten(Adsorptionszeit).

Anschließend wurde nach Absaugen des Reaktionsmediums der sog. Glycerolschock durchgeführt, durch welchen die an die Zellen adsorbierten Plasmide nach intrazellulär gelangen sollten. Hierzu wurden je 0,5 ml der Glycerolschock-Lösung auf die Zellen gebracht und nach genau 30 sec wieder abgesaugt. Nach Absaugung der Glycerolschock-Lösung wurde je einmal mit PBS und einmal mit MEM-Medium gewaschen, dann ca. 1-1,5ml frisches MEM-Medium wieder zugegeben. Geerntet wurden die Zellen nach 24 h(s. Zellernte).

Zell-Ernte für Luciferase-Assay nach transienter Expression:

Geerntet wurden die HFF's jeweils ca. 24h nach Beginn der transienten Expression bzw. ca. 28h nach dem Infektionsvorgang. Zur Ernte verwendete man das Dual-Luciferase-Reportergen-System von Promega und ging streng nach dessen Protokoll vor.

Zunächst wurde dazu das Kultur-Medium abgesaugt, danach zweimal mit PBS gewaschen. Nach Hinzufügen des Lysepuffers wurde der Lysevorgang durch 3-maliges Einfrieren (ca.20min, bei –70°) und Wiederauftauen (etwa 20min) der Zellen forciert. Das Zell-Lysat wurde dann von den Wells abgeschabt und jeweils einzeln in 1,5ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Abzentrifugation (30 sec, 13000 rpm) wurden je 20µl der Lysate in Saarstedt-Röhrchen gegeben. Diese wurden dann zur Messung am Luminometer verwendet. Die Bedienung des Gerätes sowie die Messungen wurden hierbei nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.3.2.18 Northern-Blot

Vorbereitung der RNA-Proben und Auftrennung durch Gelelektrophorese:

Es wurde Gesamt-RNA verwendet, die aus HFF extrahiert wurde (s. 3.3.2.1). Man hatte also RNA von HFF's die jeweils mock – infiziert, mit inaktivierten Virus oder mit infektiösen Virus behandelt wurden. Geerntet wurde jeweils nach 24h und nach 48h.

Pro Ansatz wurde dann 20 µg der Gesamt-RNA zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt. Hierzu wurden die vorher bei –70°C gelagerten Proben durch Zentrifugation in einer Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac) eingedampft.

Die Pellets wurden anschließend in 25µl RNA-Lade-Puffer durch Vortexen (etwa 10 s) aufgenommen.

Um eine evtl. Hybridisierung der RNA rückgängig zu machen, wurden die Proben insgesamt 15 min bei 65°C inkubiert, während dieser Zeit wurden die Proben mehrmals durch kurzes Vortexen gemischt. Die Proben wurden sofort danach auf Eis gebracht – die schlagartige Abkühlung sollte eine erneute Hybridisierung zu Doppelsträngen verhindern. Eben deshalb erfolgte auch die folgende Zentrifugation bei 4° C. Nun konnte das Gel (s.u.) mit den Proben beladen werden.

Als Leiter verwandte man 5-10mg Gesamt-RNA aus HFF die mit infektösen Virus behandelt wurden und nach 48h geerntet wurden. Die Vorbereitung der Leiter erfolgte analog der übrigen Proben. Nach Auftrennung diente sie durch Abfotografieren über UV-Licht und Anlegen eines UV-Lineals als Standard zur Größenabschätzung der RNA-Fragmente.

Gel-Bereitung zur Auftrennung von Gesamt-RNA für Northern-Blot:

Zur Auftrennung von Gesamt-RNA wurde ein 1,2 % -iges Agarose-Gel nach folgendem Protokoll hergestellt, zur Vermeidung einer Kontamination mit RNAsen waren alle Gefäße, Spatel mit Alufolie verschlossen, bei 60°C gebacken und erst kurz vor Gebrauch geöffnet :

1,62 g Agarose wurde in 141,7 ml DEPC-Wasser in einem Erlenmeyerkolben durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Vor dem Kochen wurde eine Markierung am Erlenmeyerkolben angebracht, welche die Flüssigkeitsmenge anzeigte. Die durch das Kochen bedingten Verluste konnten so durch Wiederauffüllen mit DEPC-Wasser bis zur Markierung ausgeglichen werden. War das Agarose-Pulver vollständig in Lösung gegangen, so fügte man 8 ml 20x MOPS hinzu. Nach Abkühlung dieser Lösung wurde unter dem Abzug 7,8 ml Formaldehyd zugefügt, welches die RNA in denaturierten Zustand halten sollte. Nun wurde das Gel zügig in die Gel-Kammer (RNAse-frei) gegossen und nach erhärten mit Laufpuffer (1x MOPS-Puffer) überschichtet.

Die Gelelektrophorese wurde dann für 3h bei 100 V durchgeführt. Nach Abtrennung der Leiter (s.o) und Dokumentation durch Aufnahme unter UV-Licht (Gel musste zuvor mit Ethidiumbromid nachgefärbt werden) folgte der Transfer der nun aufgetrennten RNA auf eine Membran (s. Blotting)

Blotting:

Der Transfer der zuvor aufgetrennten Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe eines Semi Dry Blotters (BIORAD) auf eine Zeta Probe GT-Membran (BIORAD). Hierzu wurden sowohl das Gel als auch die Membran zunächst für 10 min in gekühltem 1x- TBE-Puffer inkubiert danach der Blotsandwich nach Anleitung aufgebaut.

Da die Blot-Richtung vom Deckel zum Boden des Geräts(also von oben nach unten) gerichtet war, war der Aufbau des Sandwich: dickes Blotpapier - Gel – GT-Membran – dickes Blotpapier. Schließlich wurde für 30 min bei 20 V geblottet.
Nach Waschen der Membran durch kurzes Eintauchen/Durchziehen in/durch 2x SSC-Lösung und Verpacken in sauberem(nicht RNAsen kontaminiertem) Whatman-Papier wurde die Membran für 2h bei 60°C gebacken, um die RNA kovalent an die GT-Membran zu binden.

Prähybridisierung der Membran:
Mit der Absicht unspezifische Bindungstellen abzudecken, wurde die mit der RNA-beladene Membran mit einer Lachssperma(SSS)-DNA (Sambrook et al. 1989) enthaltenenen Lösung prähybridisiert. Die Prähybridisierung erfolgte für 4h bei 42°C

Herstellung der c-DNA-Sonden:
Zur Herstellung einer c-DNA-Sonde für Northern-Blot musste zunächst Gesamt-RNA, welche mit dem Rneasy Kit von Qiagen extrahiert wurde (s.3.3.2.1) durch reverse Transkription (s 3.3.2.3.1) in c-DNA umgeschrieben werden. Aus dieser c-DNA wurde dann anschließend durch PCR (s 3.3.2.3.2) mit den spezifischen Primern (s. Material Primer) die gewünschte Sequenz (in unserem Falle die von MMP-2) vervielfacht. Durch Auftragen eines kleinen Aliquots(5µl) des Amplifikats auf ein Agarosegel im analytischen Maßstab wurde nun nach elektrophoretischer Auftrennung anhand der Fragmentgröße kontrolliert, ob die gewünschte Sequenz vervielfältigt wurde. Ist dies der Fall gewesen, so wurde das übrige PCR- Produkt auf ein Agarosegel (1%) im präparativen Maßstab gebracht und nach Auftrennung durch Elektrophorese die betreffende Bande unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten (s. 3.3.2.14) Mit dem QUIAquick Gel-Extraction-Kit wurde aus diesem Gel das jeweilige DNA-Fragment extrahiert (s. 3.3.2.15).
Nach Extraktion wurde erneut die Identität und Reinheit des Fragments durch Auftragen eines kleinen Aliquots des Extraktionsproduktes auf ein analytisches Gel bestimmt (s. 3.3.2.14) Den Primern zufolge erwartete man ein Fragment der Größe 739 bp, die Kontrolle durch Gelauftragung erbrachte ein Fragment dieser Größe.
Um das erhaltene Fragment zu vermehren, wurde es in E.coli einkloniert (s.3.3.2.5.1 , 3.3.2.6 u.3.3.2.7) und durch deren Wachstum wiederum zunächst im

Mini-Präp-Ansatz vervielfältigt und anschließend extrahiert (s. 3.3.2.8). Durch Restriktionsverdau (s.3.3.2.10) und gelelektrophoretischer Auftrennug (s. 3.3.2.14) wurde der Klon ermittelt, welcher das gewünschte Plasmid trägt, ermittelt. Dieser wird nun im Maxipräp-Ansatz wiederum vervielfältigt und extrahiert (s. 3.3.2.9).

Im Anschluss an die Plasmidextraktion gewann man durch Restriktionsverdau (s. 3.3.2.10), Auftrennung der Schnittprodukte durch Gelelektrophorese in einem präparativen Gel (s. 3.3.2.14), Ausschneiden der betreffende Bande und Gel-Extraktion (s. 3.3.2.15) aus dieser Bande das gewünschte Fragment in hoher Kopienzahl.

Markierung der c-DNA-Sonde:

Zur radioaktiven Markierung der c-DNA-Sonde wurde das *„ready-to-go DNA-Labelling – Kit“* von Pharmacia® verwendet und nach dessen Anleitung vorgegangen. Es wurden hierbei je 20-40ng der Sonde mit dem Isotop [^{32}P] α - dCTP markiert. Nach der radioaktiven Markierung wurde die Sonden-Lösung durch Filtrieren über *Sephadex G50* - Fertig-Säulen nach Anleitung aufgereinigt. Das Eluat enthielt dann die gereinigte, radioaktiv-markierte Sonden-DNA. Diese konnte dann nach Denaturierung durch Inkubation bei 95°C für 5min zur Hybridisierungs-Lösung gegeben werden.

Hybridisierung der Membran:

Für die eigentliche Hybridisierung mit der c-DNA-Sonde wurde die Blot-Membran mit der Hybridisierungslösung, nach Zugabe der radioaktiv-markierten DNA-Sonde (s.o.), bei 42°C für 16-18h inkubiert.

Waschen der Membran:

Um die bei der Hybridisierung nicht spezifisch an die RNA gebundene Radioaktivität von der Blot-Membran zu entfernen und so möglichst einen Blot ohne „Hintergrunds-Radioaktivität“ zu erhalten, wurde dieser mit SDS/SSC-Lösungen bei Temperaturen mit aufsteigender Stringenz nach folgendem Schema gewaschen:

2 x 15 min mit 5xSSC / 0,1% SDS bei 42°C → 2x20 min mit 2x SSC / 0,1% SDS bei 65°C → 2x20 min mit 0,5x SSC / 0,1% SDS bei 65°C → 2x20min mit 0,1x SSC / 0,1% SDS.
Nach jedem Waschschritt wurde die Waschlösung verworfen und gegen eine frische ersetzt.

Autoradiographie der Northern-Blots:
Die radioaktive-beladene und gewaschene Membran wurde in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm in eine Röntgenkassette gelegt. Die Exposition des Filmes betrug einige Stunden bis mehrere Tage, dabei lagerte man die Röntgenkassette bei -70°C.

3.3.2.19 Western-Blot

Gewinnung der Zell-Pellets zur Untersuchung der Vimentin-Expression:
Zur Detektion der Vimentin-Expression durch Western-Blot verwendeten wir, wie schon erwähnt, Überstände von Zellen, die entweder mit Mock-Lösung infiziert, mit inaktivierten Virus behandelt oder mit AD-169 infiziert wurden. Die Ernte der Zellen (Zell-Lysate s.u.) für den Western-Blot sowie der Überstände für die Zymographie (s. 3.3.2.20) hierfür fand jeweils nach 24h, 48h und 72h statt.

Zur Gewinnung der Zell-Pellets für den Western-Blot, gab man nach Abnahme des Mediums (→Kulturüberstand, für Zymographie weiterverwandt) und zwei Waschschritten mit je 2ml PBS-Lösungen 100 µl 0,1M PBS auf den Zellrasen und schabte die Zellen darin ab. Die dadurch entstandene Zellsuspension wurde dann nach Transfer in ein Eppendorf-Gefäß bei 3000rpm für 5 min zentrifugiert, wodurch die Zellen pelletierten – der Überstand wurde verworfen.
Bis zur Durchführung des Western-Blottes bzw. der Zymographie wurden sowohl die Zell-Pellets als auch die Kultur-Überstände dann bei –70° aufbewahrt.

Gel-Präparation, Probenpräparation und Gel-Lauf für Western-Blot:

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen SDS-Polyacrylamid-Gele nach dem üblichen Protokoll (Trenngel 12%-SDS-Polyacrylamid, Sammelgel: 4-%-SDS-Polyacrylamid) angefertigt. (Sambrook et al. 1989)

Die Probenpräparation bedeutete die Herstellung von Zell-Lysaten. Hierzu wurden die Zell-Pellets zweimaligem Waschen mit PBS in 30µl PBS resuspendiert und dann diese Suspension mit je 30 µl Proben-Puffer=PBS-Gel-Lade-Puffer (1:1) versetzt und gut resuspendiert. Durch Inkubation der Proben bei 95°C für 10 min, kurzes Abzentrifugieren, Beschallung der Proben (je 3x 10 sec) im Ultraschallgerät, Inkubation bei –70° für 10 min und erneute Inkubation bei 95° für 5 min erzielte man eine effiziente Zell-Lsye. Von den so erhaltenen Zell-Lysaten wurden dann je 5 bzw. 10 µl auf das Gel gebracht.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120V für 2h. (Zusammensetzung des Lauf-Puffers s. Material)

Transfer auf Nitrozellulose-Membran (Blotting):

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Abtrennung des Sammel-Gels wurde das Trenngel für 5min im Blotting-Puffer inkubiert. Der anschließende Blot wurde im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Der Blot-Aufbau glich dabei einem Sandwich: über dem Gel (Blot-Richtung von unten nach oben) befand sich die Nitrozellulose-Membran (Hybond)-beides gemeinsam von beiden Seiten eingerahmt von je 3 Lagen Whatman-Papier. Das Blotten erfolgte bei 45V /90mA für 30-60min. (Zusammensetzung des Blotting-Puffer s. Material). Anschließend wurde die Blot-Membran zur Anfärbung der Protein-Banden für 5 min in Poincau-Rot-Lösung inkubiert. Die Leiter-Banden wurden mit Kugelschreiber markiert.

Immunchemischer Nachweis mittels Hybridisierung mit AK‘s :

Es folgte nun die eigentliche Detektion durch Hybridisierung mit Antikörpern. Nach Inkubation der Membran in 20 ml Block-Lösung, bestehend aus 4,5g (→1,5%) Milchpulver in 300 ml TBS-Lösung (pH 9,6) für 30 min, was die Bindung unspezifischer AK an verschiedene Proteine zum Ziel hatte, begann man mit der Hybridisierung des Blottes mit dem 1. AK (Anti-Human-Vimentin, AS-1,Maus,Ig G , Verdünnung 1:1000). Dazu gab man 20µl dieses Antikörpers in 20ml Block-Lösung

(s.o) und inkubierte darin die Mebran für 1h bei RT. Nach Ableeren dieser Lösung und dreimaligem Waschen mit Block-Lösung für je 10 min, folgte die Hybridisierung mit dem 2. AK (Anti-Mouse Ig G, 20µl in 20ml Blocklösung →Verdünnung 1:1000, Inkubation 1h). Dieser Antikörper band an den 1. AK und diente durch Kopplung mit einem Enzym, welches die Reagenzien 1+2 (s.u.) unter Fluoreszenz umsetzte zur Nachweisreaktion. Der Blot wurde nach Abkippen der Hybridisierungs-Lösung zunächst 3x mit (je 50ml) TBS-Lösung dann noch 1x in 50 ml 50mM Tris-HCl-Lösung (pH 7,5) gewaschen. Nachdem der Blot mit Whatman-Papier kurz trocken getupft wurde, inkubierte man den Blot in die zuvor zu gleichen Teilen vermischten Reagenz-Lösungen 1+2 (Amersham Pharmacia Biotech) und legte nach erneutem Trockentupfen auf einen Röntgenfilm. Die Belichtungszeit betrug 1, 5 und 10 min.

3.3.2.20 Zymographie

Die Enzyme werden hierbei auf einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Während dieser Auftrennung sind die Enzyme einerseits durch die Ingredienzien des Gels (SDS), andererseits durch die geringe Temperatur beim Gel-Lauf (auf Eis!) denaturiert bzw. inaktiviert. Bei der Präparation wird das Polyacrylamid Gel mit dem jeweiligen Substrat (z.B. gekochtes Collagen Typ III = Gelatine s. 1.4.1.1 und 1.4.2.1) copolymerisiert.

Um auch unspezifische Metalloproteinasen zu detektieren wird oft zusätzlich zum Collagen-Gel ein Casein-Gel verwendet. Da wir uns bei unseren Experimenten auf die Untersuchung der MMP-2-Aktivität beschränkten, verzichteten wir auf eine Zymographie auf Caseingelen.

Nach dem Gel-Lauf, durch den die Enzyme auch von ihren Inhibitoren getrennt wurden, wurden sie durch Inkubation der Gele in einem Triton X-100-haltigen Puffer Renaturationspuffer, welcher das SDS aus den Gelen entfernt wieder renaturiert und damit aktiviert. Während einer mehrstündigen Inkubationsphase bei 37°C (meist über Nacht) konnte dann das Substrat durch das Enzym degradiert werden.

Durch anschließendes Färben mit Coomassie-Blue, welches Proteine, also auch das Substrat Kollagen, anfärbte und mildes Entfärben mit einer wässrigen Methanol-

Essigsäure-Lösung ließ sich das Resultat dieser Degradation darstellen. Die Stellen, an welche das Enzym gewandert und aktiv war, erschienen als helle Banden gegen blauen Hintergrund. Die Stärke/Größe dieser Bande korrelierte mit der Aktivität des jeweiligen Enzyms. Eine Zymographie bestand aus mehreren Teilschritten Probengewinnung, Gelpräparation + Copolymerisation mit Substrat, Proben-Präparation u. –Auftragung, Gel-Lauf (Enzyme in denaturiertem = inaktiven Zustand), Renaturation der Enzyme, Degradation des Substrates durch das Enzym, Färben und Entfärben der Gele, Auswertung. Diese Einzelschritte werden im Folgenden nochmals genauer erklärt:

Gewinnung von Probenmaterial:

Zur Untersuchung auf MMP-Enzymaktivitäten mittels Zymographie verwendeten wir ausschließlich Kultur-Überstande von HFF-Zellen, die analog zu den Northern- und Western-Experimenten entweder mit Mock-Lösung, oder infektiösen Viren behandelt wurden und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion geerntet wurden(s. 3.2.1.4 u. 3.2.1.5). Die Zellen selbst wurden abtrypsiniert und für den Vimentin-Western-Blot verwendet (s. 3.3.2.19)

Da normal-hohe FCS – Konzentrationen (normal = 10% FCS in Kulturmedium) bei der Zymographie durch Unscharfwerden der Bandenkontur störten, tauschte man jeweils 24h vor dem Erntevorgang das 10%- – FCS – enthaltende Medium gegen ein 0,1%-FCS-haltiges MEM-Medium aus.

Man wählte dieses Vorgehen, weil man so exaktere Aussagen zur Regulation der MMP-Aktivität in Abhängigkeit von der Infetkionsdauer machen konnte. Bei einem generellen Medium-Wechsel z.B. 3h nach Infektion wären Unterschiede in der Regulation der MMP in Abhängigkeit der Infektionsdauer aufgrund der Kumulation evtl. weniger deutlich erkennbar.

Um eine höhere Konzentration der MMP’s in den Überständen zu erzielen, aber trotzdem ein Hungern oder gar Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurde anstelle von 5ml beim Mediumwechsel nur noch 3ml MEM-Medium (0,1%-FCS) auf die Zellen gegeben.

Aufgrund der Tatsache, dass die Zellzahl über die Menge an produzierten MMP’s auch deren Aktivität beeinflussen kann, wurde nach Ernte der Kultur-Überstände die Zellzahl pro Well bestimmt (s. 3.2.1.6)

Nach der Ernte wurden die Überstände bis zur Durchführung der Zymographie bei –70°C gelagert.

Gelpräparation:

Wie schon oben erwähnt beschränkten wir uns bei unseren Experimenten auf Zymographien auf collagen-copolymerisierten Gelen. Da es das Hauptsubstrat für die MMP-2 darstellt, benutzte man gekochtes Collagen Typ III (Collagen Type III c-3511 von SIGMA) zur Copolymerisation.

Zunächst präparierte man als Trenngel ein übliches 7,5%-iges Polyacrylamid(PAA)-Gel(angegebene Gesamtmenge 20 ml reicht für zwei Gele). Hierzu pipettierte man in ein geeignetes Gefäß:

Trenn-Gel (7,5% -PAA-Gel)

4,76 ml	30%ige Acrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel A, BIO-RAD)
3,76 ml	2%-ige Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel B, BIO-RAD)
200 µl	10%-iges SDS
3,94 ml	Tris-Puffer-Lösung (pH 8,8)
6,34 ml	Aqua bidest.
19 ml	Gesamtmenge

Ebenso bereitete man ein Sammel-Gel, die Gesamtmenge von 10 ml reichte auch hierbei für zwei Gele.

Sammel-Gel

933 µl	30%iger Acrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel A, ROTH)
796 µl	2%-iger Bisacrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel B, ROTH)
101 µl	10%-iges SDS
1,25 ml	Tris-Puffer-Lösung (pH 6,8)
6,98 ml	Aqua bidest.
10 ml	Gesamtmenge

Außerdem wurde in ein kleines Eppendorf-Gefäß 40mg Collagen III abgewogen und nach Zugabe von 1ml Aqua bidest. durch Erhitzen für 30 min bei 90° in Lösung gebracht (Gelatine-Lösung). Durch anschließendes abzentrifugieren 10000 rpm bei RT wurden dann die ungelösten Bestandteile abgetrennt.

Der Überstand wurde der übrigen Trenn-Gel-Zubereitung (s.o) zugefügt, wodurch eine Gesamtmenge von 20ml entstand. Zur Polymerisation wurde diesen 20ml des Trenn-Geles und den 10 des Sammel-Geles unmittelbar vor dem Gießen 160µl Ammoniumperoxidsulfat (APS) und 12 µl TEMED (SIGMA) beigesetzt.
Gegossen wurden die Gele in eine handelsübliche Western-Blot-Apparatur (BIORAD) mit üblichem Procedere. (Trenn-Gel gießen mit Methanol-Laufpuffer überschichten – Sammel-Gel gießen etc.) Die gegossenen Gele wurden in der Gel-Lauf-Apparatur mit Laufpuffer (10 x-Puffer rotiphorese SDS-PAGE von ROTH (0,25 M Tris, 1,92M Glycin 1% (g/v) SDS, Aqua bidest.) welchen man zuvor zehnfach verdünnt und auf 4°C gekühlt hatte (100ml 10x-Laufpuffer auf 900ml Aqua bidest.) umgeben.

Proben-Präparation, Proben-Auftragung und Gel-Lauf:
Nach vorsichtigem Auftauen der Proben (s.o.) auf Eis wurden diese jeweils mit Probenpuffer (Zymogramm Sample Buffer von BIORAD) im Verhältnis 1:1 oder 1:2 versetzt und mit diesem durch Auf- und Abpipettieren vermischt. 15µl dieses Probenpuffer – Proben – Gemisches setzte man dann jeweils zur Auftrennung und Zymographie ein. Als Leiter verwendete man ein jeweils ein 10 µl Aliquot eines kDa Standards (kDa-Standard high range von BIORAD). Die leeren Taschen des Gels wurden, um eine Verzerrung des Gels zu vermeiden mit 15 µl Probenpuffer aufgefüllt. Der Gel-Lauf fand in auf 4°C gekühlten Laufpuffer auf Eis bei 150V,90 mA für etwa 2h statt.

Nach der Auftrennung wurde das Sammel-Gel vorsichtig vom Trenn-Gel mit einem Skalpell abgeschnitten.

Renaturierung und „Entwicklung“:
Um die MMP’s aus der denaturierten, d.h. inaktiven Form wieder in die aktive überzuführen, musste das denaturierende Agens SDS aus dem Gel entfernt werden. Hierzu verwendet man einen sog. Renaturierungs-Puffer (1x Renaturation Buffer von BIORAD). Durch Inkubation der Gele für 30 min auf einem Orbital-Shaker bei RT in diesem Puffer wurde durch seinen Inhaltstoff Triton X-100 (2,5%) das SDS entfernt und so das Enzym renaturiert, also wieder aktiviert.

Der Abbau des Substrates Collagen III durch die MMP's fand dann durch Inkubation der Gele für 12-16 h bei 37°C auf einem Orbital-Shaker in einem sog. Development-Puffer (1x Development-Buffer von BIORAD) statt.

Färben und Entfärben:

Zur Darstellung der Areale, an welchen die MMP's ihr Substrat abgebaut haben, färbte man das Substrat (Collagen III) mit Coomassie-Blue an. Dies geschah durch Inkubation der Gele für mind. 1h bei RT in einer Coomassie-Blue-Färbelösung (0,5% Coomassie-Blue, 40% Methanol, 10% Essigsäure in Aqua bidest.)

Um die Banden des Collagen-Abbaus besser sichtbar zu machen folgte noch eine „Entfärbung" der Gele in einer Entfärbe-Lösung (40% Methanol, 10% Essigsäure in Aqua bidest.) für etwa 30 min. Die Banden sollten nach dieser Zeit klar sichtbar sein, das übrige Gel dagegen noch den charakteristischen tiefblauen Farbton aufweisen.

3.3.3 Statistik

Da es sich bei der vorliegenden Dissertation um eine experimentelle Laborarbeit mit überwiegend qualitativen bzw. semiquantitativen Ergebnisauswertungen handelt, wurden nur eingeschränkt statistische Methoden angewandt.

Bei der Darstellung der Ergebnisse der Transfektionsexperimente (s. 4.1) aus dem Luciferase-Assay wurden die Ergebnisse des Luminometer – vom Gerät als Quotient RLU1/RLU2 ausgegeben - aus mehreren Meßreihen (n=16) arrithmetisch gemittelt, und nach Berechnung der Fehlerbalken nach der Formel (Standardabweichung / Wurzel (n)) die Werte in einem Balken-Diagramm (s. Abbildung 8) dargestellt.

Bei der Darstellung der Zellzahlen der Zymographie- und Westernblot-Experimente wurde die relatve Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer wie unter 3.2.1.6 beschrieben gezählt und nach arrithmetischer Mittelung (n=4) und Berechnung der Fehlerbalken nach der Formel Standardabweichung in einem Balken-Diagramm dargestellt (s. Abbildung 14)

4. Ergebnisse

4.1 Veränderung in der MMP2 Promotor-Aktivität in HFF-Zellen durch eine HCMV-Infektion

Um die Regulation von Genen auf Promotor-Ebenen zu untersuchen, gibt es verschiedene Methoden. Wegen seiner relativ einfachen Durchführung und der guten Quantifizierbarkeit entschieden wir uns bei der Untersuchung der Regulation des MMP-2-Promotors für die Detektionsmethode des Luciferase-Tests. Hierzu wurden zwei unterschiedlich große Bereiche des Promotors in einen Firefly-Luciferase-Vektor kloniert, um nach transienter Expression dieser Promotor-Reportergen-Konstrukte deren Aktivität zu messen. Das Prinzip eines solchen Promotor-Reportergen-Konstruktes beruht darauf, daß durch die Kopplung des zu untersuchenden Promotors an ein Reportergen eine Stimulierung des Promotors meßbar wird. Im Falle des Firefly-Luciferase-Vektors beeinflußt die Regulation des Promotors die Expression des Firefly-Luciferase-Gens, welches wiederum durch den Luciferase-Assay meßbare Lichtblitze generiert, welche in ihrer Quantität zur Stimulierung des Promotors proportional sind.

Bei der Gewinnung von Plasmiden für die Transiente Expression wurde ähnlich vorgegangen wie bei Herstellung der Northern-Blot-c-DNA-Sonde. Ausgangspunkt war jedoch Gesamt-DNA, welche auch aus HFF extrahiert wird (s.3.3.2.2). Auch hier wurde die gewünschte Sequenz mit den dafür spezifischen Primern (s. Material) in diesem Fall mittels Touchdown-PCR vervielfältigt (s. 3.3.2.4). Die dabei amplifizierten Sequenzen nannten wir 1p und 1230p. Aus welchem Abschnitt der Promotor-Region diese Sequenzen stammen und welche Größe sie besitzen ist in Abbildung 6 dargestellt.

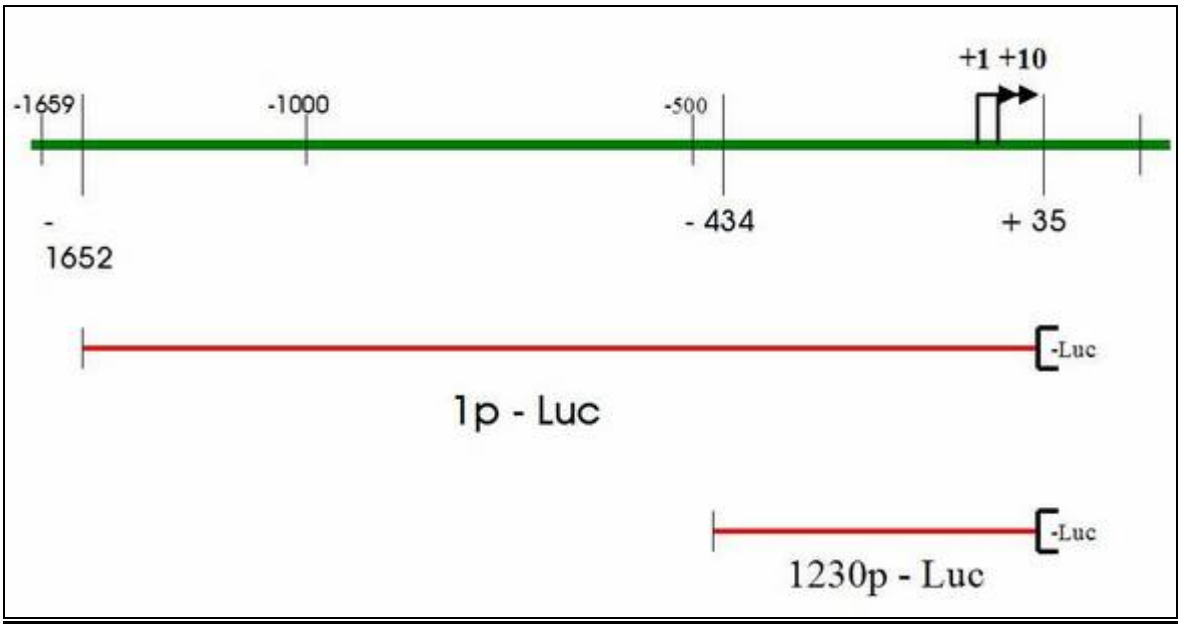


Abbildung 6: Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte

Es sind die zu den Transfektion-Experimenten eingesetzten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte dargestellt – sowie aus welchem Bereich des MMP-2-Promotor diese kloniert wurden.
1p-Luc = Luciferase-Plasmid + vollständiger MMP-2-Promotor (von -1652 bis +35)
1230p-Luc = Luciferase-Plasmid + Teilsequenz des MMP-2-Promotors (von -434 bis +35)

Nach Klonierung der jeweiligen Fragmente in das Plasmid pGL3 und Einklonierung in E.coli (s. 3.3.2.5.2 , 3.3.2.6 u. 3.3.2.7) wurde analog zum Vorgehen bei der Herstellung der Northern-Sonde, das Plasmid mit den Inserts 1p und1230p durch Mini- (s. 3.3.2.8) und Maxi-Präp(s. 3.3.2.9) vermehrt bzw. extrahiert. Als Kontrolle, ob das Plasmid das gewünschte Insert auch wirklich trägt wurde sowohl ein durch Restriktionsverdau mit den das Fragment aus dem Plasmid schneidenden Enzymen (welche auch zur Einklonierung verwandt wurden s. 3.3.2.5.2) als auch eine Sequenzierung mit anschließendem Sequenzvergleich durchgeführt (s.3.3.2.13). Das Ergebnis dieses Restriktionsverdau ist in **Abbildung 7** dargestellt.

Nach Bestimmung der Konzentration mittels OD-Methode (s. 3.3.2.16) konnte das so gewonnene Plasmid für Transfektionsexperimente (s.3.3.2.17) verwendet werden. Die transiente Expression, die Zellernte sowie die Probenaufbereitung wurde nach dem unter 3.3.2.17 beschriebenen Procedere durchgeführt.

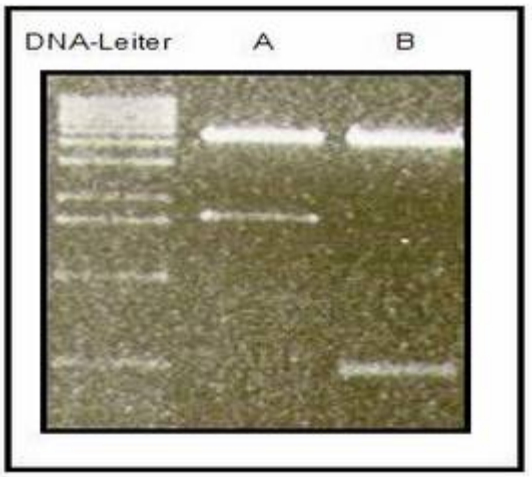


Abbildung 7: Fragmente 1p, 1230p nach Restriktionsverdau:

Restriktionsverdau der zu den Transfektionsexperimenten eingesetzten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten 1p und 1230p mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Hind III: Es fallen die zuvor einklonierten Inserts (1p-Fragment, 1230p-Fragment) wieder heraus – in der Gelelektrophorese erkennt man das eröffnete, leere Plasmid pGL3 (obere Bande, sowie die Inserts/Fragmente 1p (vollständiger MMP-2-Promotor, 1687 bp) und 1230p (MMP-2-Promotor – Teilsequenz, 479bp**).**

A: nach Restriktionsverdau mit Kpn I B: nach Restriktionsverdau mit Hind III

Messung der MMP-2-Promotoraktivität mittels Luciferase-Assay am Luminometer:

Die Messung erfolgte nach Gebrauchsanleitung des Luminometer sowie nach Protokoll des Dual-Luciferase-Reportergen-System von Promega®. Es wurden am Luminometer jeweils zwei Aktivitäten detektiert und dessen Werte angezeigt:

1. Wert (RLU1) → Aktivität der jeweiligen Firefly-Luciferase ("experimenteller" Wert)
2. Wert (RLU2) → Aktivität der Renilla-Luciferase (Kontroll-Wert)

Vom Gerät wurde dann ein Quotient RLU1 / RLU2 gebildet, der die spezifische Aktivierung des "experimentellen" Promotors angab.

Auswertung und Verarbeitung der Ergebnisse:

Man bekam also Aktivitätswerte für den den vollständigen MMP-2-Promotor tragenden pGL3-Vektor(1p-Luc), für den den unvollständigen MMP-2-Promotor tragenden Vektor (1230p-Luc) sowie für den promotor-losen pGL3 Vektor (Luc-leer) für jeweils mock- und AD-169-infizierte HFF's.

Die korrelierenden Aktivitäten mehrerer Meßreihen (n=16) wurden arrithmetisch gemittelt, und nach Berechnung der Fehlerbalken nach der Formel (Standardabweichung / Wurzel (n) – n=16) die Werte in einem Balken-Diagramm (s. Abbildung 8) dargestellt .

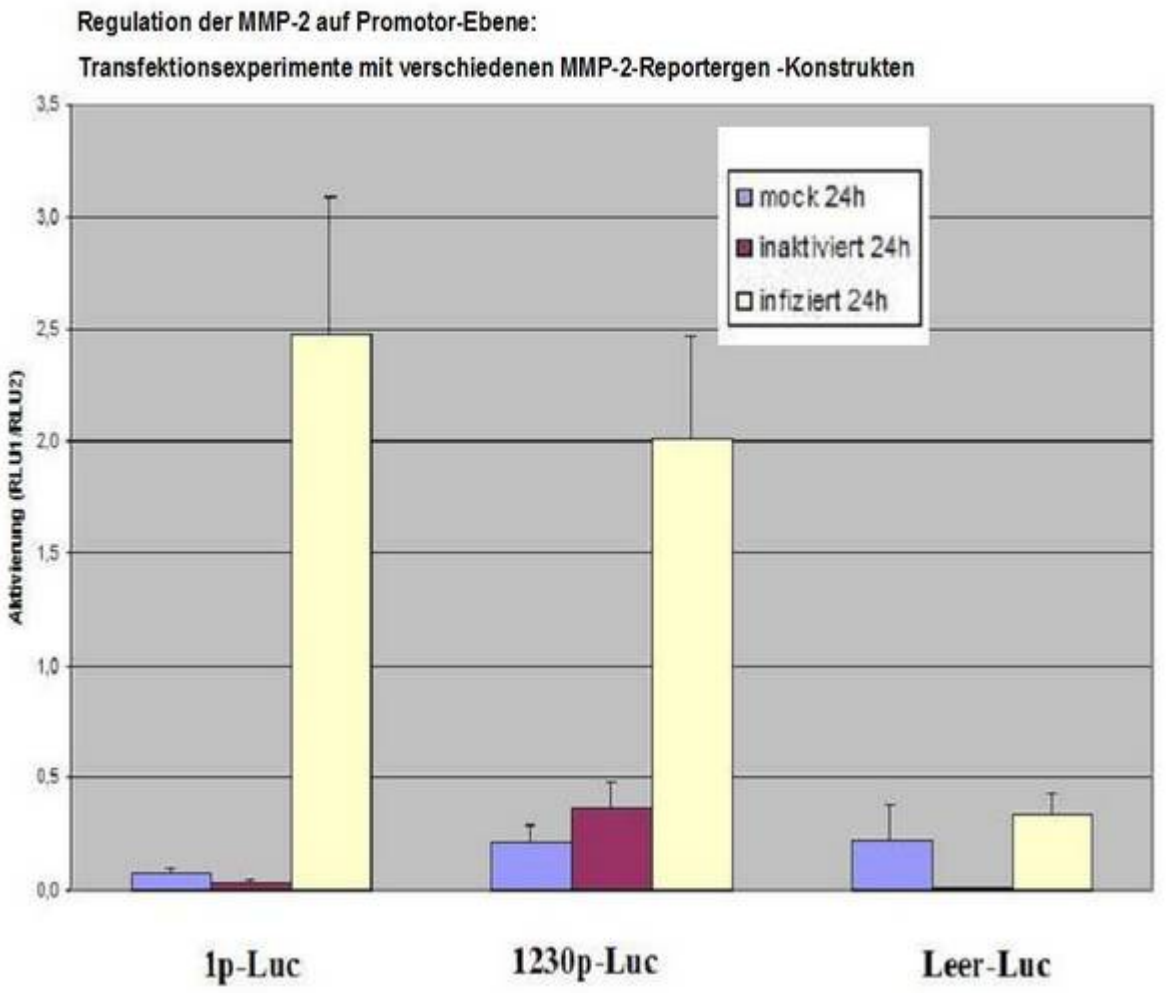


Abbildung 8: Ermittlung der Regulation Matrixmetalloproteinase-2-Promotors im Luciferase- Assay:

1p-Luc = Luciferase-Vektor + kompletter MMP-2-Promotor
1230p-Luc = Luciferase-Vektor + MMP-2-Promotor-Teilsequenz
Leer-Luc = leerer Luciferase-Vektor

Das Diagramm zeigt jeweils das Verhältnis aus Firefly- zu Renilla-Aktivität (RLU1:RLU2), dieses Verhältnis korreliert mit dem Aktivierungsgrad des jeweiligen Promotors bzw. des Promotorfragments. Mock24h, inaktiviert24h und infiziert24h bedeutet, daß es sich um Zell-Lysate handelte, bei welchen die Zellen jeweils nach 24h nach Infektion mit Sucrosephosphat=„mock"-Lösung, mit inaktiviertem Virus oder mit AD169-Virus geerntet wurden. Die Fehlerbalken wurden nach der Formel (Standarbweichung/Wurzel (n) – n=16) berechnet.

Das Verhältnis aus Firefly- zu renilla-Luciferase zeigt beim vollständigen MMP-2-Promotor-Reporter-Genkonstrukt 1p-Luc eine ca. 30-fach erhöhte Aktivität gegenüber bei den infizierten Zellen gegenüber den mock-infizierten Zellen.
Beim unvollständigen MMP-2-Promotor-Reportergen-Konstrukt 1230p-Luc erkennt man eine etwa 8-fach erhöhte Aktivität bei den mit AD 169 infizierten gegenüber den mock-infizierten Zellen – der vollständige Promotor wird also in einem höheren Maß stimuliert als die Promotorteilsequenz. Ein Grund dafür könnte die Mehrzahl an Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im vollständigen Promotor sein – so liegen die SP1-Bindungsstellen beide in Nähe des Beginns des Luc-Gens und sind somit auf beiden Promotor-Reporter-Gen-Konstrukten vorhanden, wohingegen die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren p53, AP1/rev und AP2 nur auf dem den vollständigen MMP-2-Promotor enthaltendem Promotor-Reporter-Gen-Konstrukt vorhanden sind.
Betrachtet man den promotorlosen Vektor, so zeigt sich eine allenfalls nur geringgradige, nicht signifikant erhöhte Aktivität der Firefly-Luciferase in AD169 - infizierten gegenüber den mock-infizierten Zellen.
Erwähnenswert ist außerdem, daß bei den Transfektionsexperimenten es durch Inokulation mit UV-inaktiviertem HCMV zu keiner signifikanten Stimulation des MMP-2-Promotors kam, so daß die Promotoraktivierung auf einen Effekt während der Virus-Replikation schließen lassen und nicht allein durch auch bei Inokulation mit nicht-infektiösem Virus in die Wirtszelle gelangte Virusbestandteile ausgelöst wird.
Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß unter den geschilderten Versuchsbedingungen im Rahmen einer Infektion zu einer starken Aktivierung des MMP-2-Promotors kommt, welche wahrscheinlich unter anderem über die Bindung von Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Die Kontrolle mit der UV-inaktivierten Variante wies daraufhin, daß es sich hierbei um einen Effekt der Virus-Replikation und nicht nur um Kontakt der Zelle mit Virusbestandteilen handeln müßte.
Eine derartig gesteigerte Promotoraktivierung läßt auch eine verstärkte Transkription und letztenendes eine verstärkte Translation also eine Erhöhung der Biosynthese der MMP-2 vermuten. Um dies zu untersuchen, wurden weitere Experimente zur Überprüfung der Regulation der MMP-2 nach Infektion durchgeführt: auf Transkriptionsebene mittels Northern-Blot und auf Proteinebene mittels Zymographie.

4.2 Veränderung der MMP2 - m-RNA durch den Vorgang der Infektion

Northern Blot

Mit der Methode Northern-Blot kann die Regulation von Genen auf der Ebene der Transkription anhand der m-RNA-Menge bestimmt werden. Es lassen sich einerseits qualitative Aussagen darüber treffen, ob ein Gen überhaupt transkribiert wird, andererseits ist bei geeigneten Kontrollen auch eine Quantifizierung der Transkriptionsrate möglich.

Die für die c-DNA-Sonde gewünschte Sequenz wurde hierbei wie unter 3.3.2.18 beschrieben hergestellt. Diese wurde dann, nach erneuter gelelektrophoretischer Kontrolle (s. 3.3.2.14 und) und Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der OD-Methode (s. 3.3.2.16), als c-DNA-Sonde für den Northern-Blot verwendet (s.3.3.2.18 und Abbildung 9).

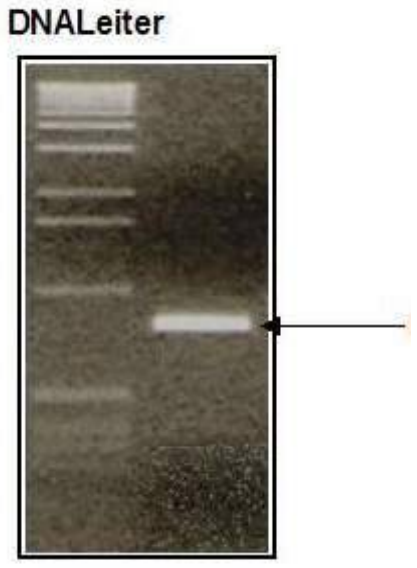


Abbildung 9: Gelelektrophoretische Kontrolle der zum Northern-Blot eingesetzten Matrix-Metalloproteinase-2 - c-DNA-Sonde :

Der Pfeil markiert die nach Vervielfältigung erhaltene Matrixmetalloproteinase-2-c-DNA-Sonde – wie erwartet mit einer Größe von 739bp.

Darüber hinaus wurde die Identität des durch diese Prozedur erhaltenen Fragments auch durch Sequenzierung mit anschließendem Sequenzvergleich kontrolliert (s.3.3.2.13).

Aus welchem Bereich des MMP-2 Gens die c-DNA-Sequenz für die Northern-Blot-Sonde stammte, ist in Abbildung 10 dargestellt.

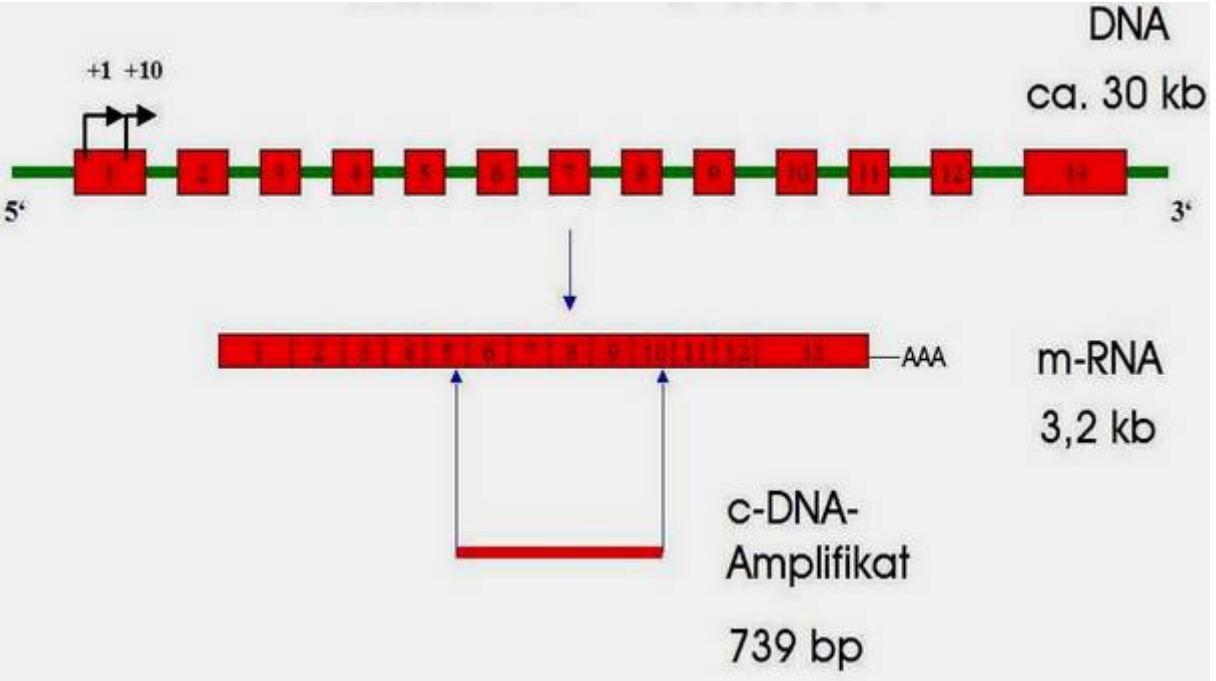


Abbildung 10: Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2)- c-DNA im Kontext des Gesamt-MMP-2-Gens- vgl. auch Abbildung 4

5' = 5' –Ende 3' = 3'-Ende -AAA = „Poly-A-Rest" bp = Basenpaare kb = Kilobasenpaare

Die Abbildung zeigt, aus welchem Bereich des MMP-2-Gens das zur Hybridisierung des Northern-Blots eingesetzte c-DNA-Amplifikat stammt. Die Größe des Amplifikats beträgt 739 bp.

Die Northern-Blot-Experimente wurden wie unter 3.3.2.18 beschrieben durchgeführt. Neben der Hybridisierung des Blottes mit der MMP-2-c-DNA-Sonde wurde quasi als Kontrolle den Blot außerdem mit einer GAPDH-c-DNA-Sonde hybridisiert (s.u.).

Die Blots wurden anhand der Autoradiographie semiquantitativ ausgewertet, d.h. es wurden die Stärken einzelnen Banden bezüglich des Infektionsstatuses (m,ia,i) sowie des Ernte-Zeitpunktes der m-RNA nach Infektion (24 + 48 h.p.i.) verglichen.

Um auf Veränderungen auf Ebene der Transkription (m-RNA-Level) rückschließen zu können, wurde dabei die Banden innerhalb einer Hybridisierung mit der MMP-2-Northern-Blot-Sonde, die die MMP-2-RNA-Level anzeigenden Banden einerseits, mit denen die durch Hybridisierung mit GAPDH-c-DNA-Sonde zustandekamen, andererseits verglichen. GAPDH gilt als sog. Housekeeping-Enzym, dessen Aktivität bzw. auch dessen Transkriptionsrate sich nicht durch den Infektionsvorgang (m, ia, i) ändert. Auf diese Weise konnten praktisch Unterschiede der Bandenstärke die lediglich, darauf zurückzuführen waren, daß nicht exakt gleiche Mengen an RNA aufgetragen wurden, richtig zugeordnet werden.

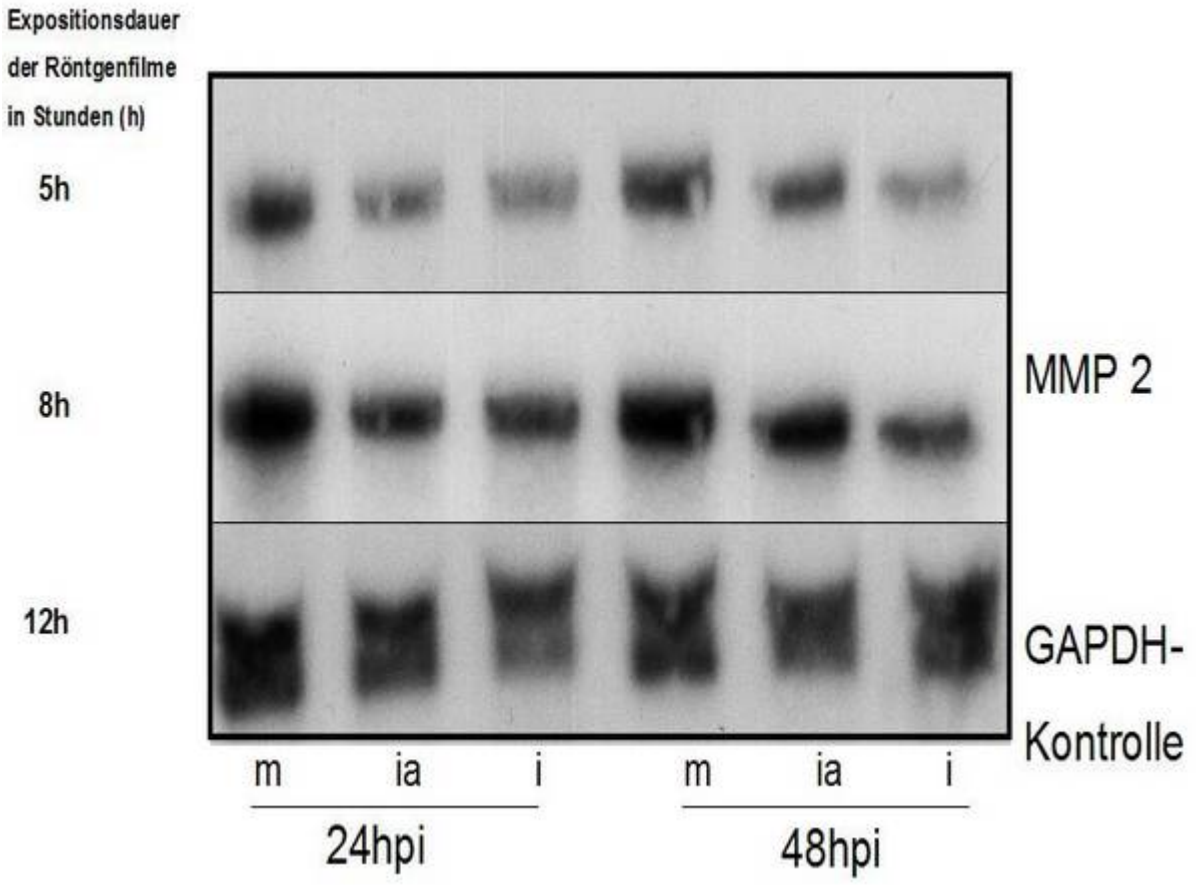


Abbildung 11: Northern-Blot mit MMP-2-c-DNA-Sonde und GAPDH-Kontrolle:
m = mit mock-Lösung inokuliert
ia = mit UV-inaktivierten Viren inokuliert
i = mit Laborstamm AD 169 infiziert hpi = „hours post infection" → Stunden nach Infektion
MMP-2 = Matrix-Metalloproteinase-2 GAPDH = Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Zur Kontrolle der RNA-Auftragungsmenge ist der Blot zusätzlich mit GAPDH hybridisiert worden (unten).

Die **Abbildung 11** zeigt, daß tendenziell die Transkriptionsrate des MMP-2-Gens in mit AD 169 infizierten Zellen im Vergleich zu den mock-infizierten Zellen abnimmt. Dieser Effekt wird besonders 48 Stunden nach Infektion deutlich.
Zur Kontrolle der RNA-Auftragungsmenge ist der Blot zusätzlich mit GAPDH hybridisiert worden, einem sog. Housekeeping-Enzym, dessen Transkriptionsrate laut Literatur nicht durch eine HCMV-Infektion verändert werden sollte.
Zwar zeigt sich dadurch eine leicht unterschiedliche Auftragungsmenge an RNA, jedoch wird trotzdem deutlich daß die m-RNA-Menge der MMP-2 in infizierten Zellen abnimmt, was einer verminderten Transkriptionsrate entspricht.

4.3 Veränderung in der MMP-2 – Enzymaktivität in Bezug auf die Zellzahl sowie der Produktion an Gesamtprotein

4.3.1 Ergebnisse der Zymographie:

Da bei der Untersuchung von Enzymwirkungen nicht so sehr die Quantität des Enzyms entscheidend ist, sondern seine Aktivität, wurde versucht, Methoden zu entwickeln, mit der genau diese Enzymaktivität zu detektieren ist.

Die Zymographie ist eine relativ neuartige Methode, mit welcher man die Enzymaktivität von Matrix-Metalloproteinasen untersuchen kann (Kleiner u. Stetler Stevenson 1994; Heusson u. Douwdle 1980).
Mit dieser Methode konnte also auch die Veränderungen der MMP-2-Aktivität in HFF-Zellen infolge einer HCMV-Infektion untersucht werden. Wegen der Tatsache, daß die MMP-2 wie auch die anderen MMP's von den Zellen in den Extrazellularraum abgegeben werden, wurden hierbei nicht Zell-Lysate, sondern die Zellkulturüberstände mittels Zymographie auf die MMP-2-Aktivität untersucht.
Hierzu wurden HFF-Zellen wie unter 3.2.1.5 beschrieben mit dem HCMV-Laborstamm AD 169 infiziert bzw. mit Mock-Lösung inokuliert.

Bei Vorversuchen fiel auf, daß hohe FCS-Konzentrationen im Kulturmedium die Aussagekraft der Zymographie durch Unschärfe der Bandenkontur stark einschränkten (s. auch **Abbildung 12**).

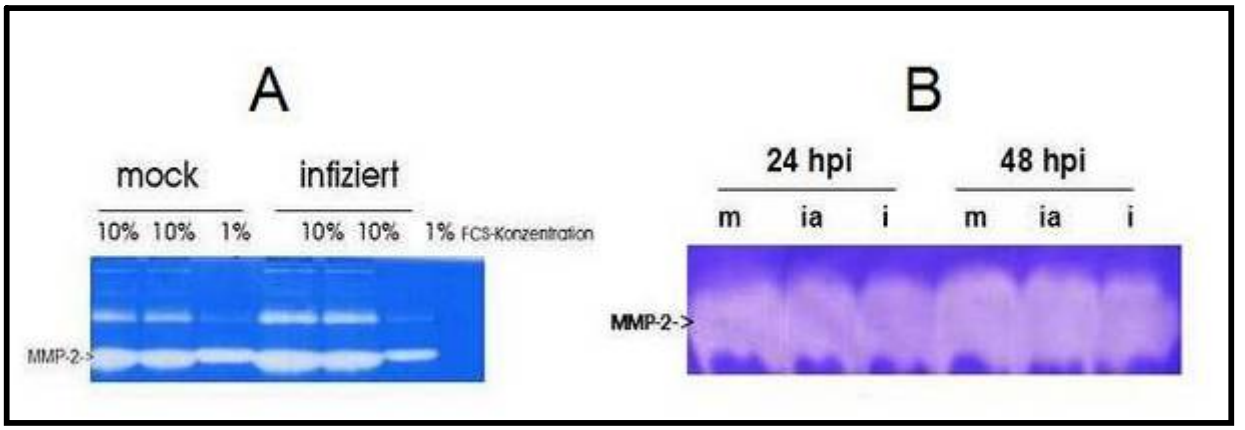


Abbildung 12: Vergleich der Zymographie-Banden in Abhängigkeit der FCS-Konzentration im Medium:

m = mit mock-Lösung inokuliert
ia = mit UV-inaktivierten Viren inokuliert
i = mit Laborstamm AD 169 infiziert
FCS = „fetal calf serum" → fetales Kälberserum
MMP-2 = Matrixmetalloproteinase-2
hpi = „hours post infection" → Stunden nach Infektion

Zur Zymographie wurden Zellkultur-Überstände von entweder mit mock-Lösung, mit UV-inaktivierten oder mit dem HCMV-Laborstamm AD169 inokulierten HFF- (=„human foreskin fibroblasts" humane Vorhautfibroblasten-) Zellen eingesetzt.
Unter A ist ein Zymographie-Gel abgebildet, bei welchem jeweils Kultur-Überstände mit 10% FCS-haltigen Medium oder 1%FCS-haltigen Medium von entweder mit mock-Lösung oder mit AD169 inokulierten HFF-Zellen aufgetragen wurden.
Unter B ist ein Zymographie-Gel abgebildet, bei welchem 10% FCS-haltige Kultur-Überstände aufgetragen wurden, die zuvor noch 5-fach ankonzentriert wurden

Je nach Konzentration von FCS (= „fetal calf serum" = fetales Kälberserum) ist nicht nur die Größe, sondern auch die Konturschärfe der Banden sehr unterschiedlich. Es zeigte sich, daß die MMP-2-Banden bei 1%FCS-haltigen Kulturüberständen zwar deutlich kleiner aber auch deutlich konturschärfer ausfallen. Bei den 10% FCS-haltigen Kulturüberständen scheinen die Banden regelrecht ausgefranst, was eine sinnvolle quantitative Auswertung unmöglich machte.

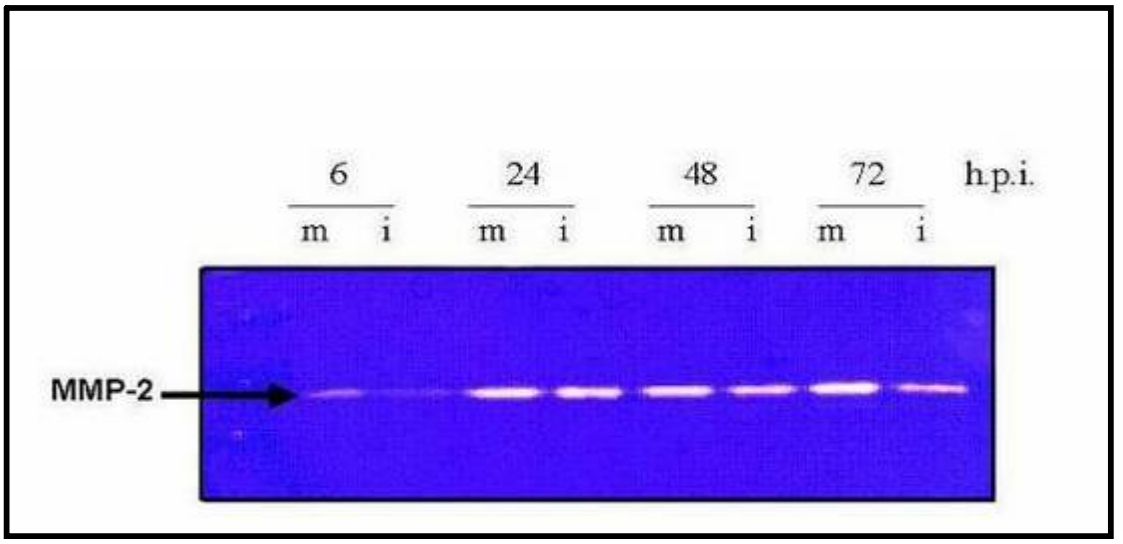
Wir wählten deshalb zur Untersuchung mittels Zymographie ein 0,1%FCS-haltiges Medium, welches jedoch zur Vermeidung eines ausgeprägten Aushungerns der Kultur erst 24 Stunden vor Ernte auf die Zellen gegeben wurde. Zwar war dadurch die Menge des ins Medium sezernierten MMP-2-Enzyms absolut geringer, jedoch waren so auch relativ diskrete Veränderungen in der MMP-2-Aktivität aufgrund schärferer Bandenkontur besser sichtbar.

Die Zellkultur-Überstände für die Zymographien wurden jeweils 6h, 24h, 48h und 72h nach dem Infektionsvorgang geerntet. Nach passagerer Lagerung der Überstände bei -70°C wurde dann die eigentliche Zymographie wie unter 3.3.2.20 beschrieben durchgeführt.

Auswertung der Gele:

Die Banden wurden untereinander ins Verhältnis gesetzt, dies erfolgte ebenfalls semiquantitativ, d.h. per Augenmaß. Es wurde dabei v.a. auf Unterschiede in der Enzymaktivität bezüglich des Infektionsstatuses (m, ia, i) sowie der Dauer der Infektion (24h-60h) geachtet. Zur Aufbewahrung wurden die Gele in Aqua bidest. enthaltende Plastikfolien eingetütet und zu Dokumentation auf einem auf einem Scanner im Durchlichtverfahren eingescannt.

Auf der Ebene der Enzymaktivität (s. **<u>Abbildung 13</u>**)**,** zeigt sich eine deutliche Abnahme der Aktivität der MMP-2 in AD169-infizierten Zellen im Vergleich zu mock-infizierten Zellen. Der Effekt wird umso deutlicher, je länger eine Infektion bestand.



<u>Abbildung 13: Zymographie aus Überständen mock- und AD169-infizierter Zellen:</u>

m = mit mock-Lösung inokuliert
i = mit Laborstamm AD 169 infiziert

MMP-2 = Matrix-Metalloproteinase 2
hpi = „hours post infection“ → Stunden nach Infektion

Es wurden Zellkulturüberstände von mock-infizierten und mit AD169-infizierten Zellen verwendet. Die Überstände wurden jeweils nach 6h, 24h, 48h sowie 72h abgenommen

Man sieht einerseits, daß die Menge an MMP-2 nach 6h noch sehr gering ist, bereits nach 24h jedoch deutlich zugenommen hat und dann in etwa gleich bleibt. Andererseits fällt im Vergleich der MMP-2 Aktivität in Überständen mock-infizierter Zellen gegenüber den mit AD169-infizierten Zellen tendenziell eine Verringerung auf. 72 Stunden nach Infektion ist dieser Effekt am deutlichsten**.**

4.3.2 Relative Zellzahlen in Abhängigkeit von Infektionsstatus und Infektionsdauer:

Da die gemessene Enzymaktivität maßgeblich sowohl von der Anzahl der das Enzym produzierenden Zellen sowie deren Vitalität abhängt, wurden die Zellen nach Abnahme der Kulturüberstände geerntet und in einer Neubauer-Zählkammer, wie unter Punkt 3.2.1.6 erwähnt, gezählt(s. **Abbildung 14**).

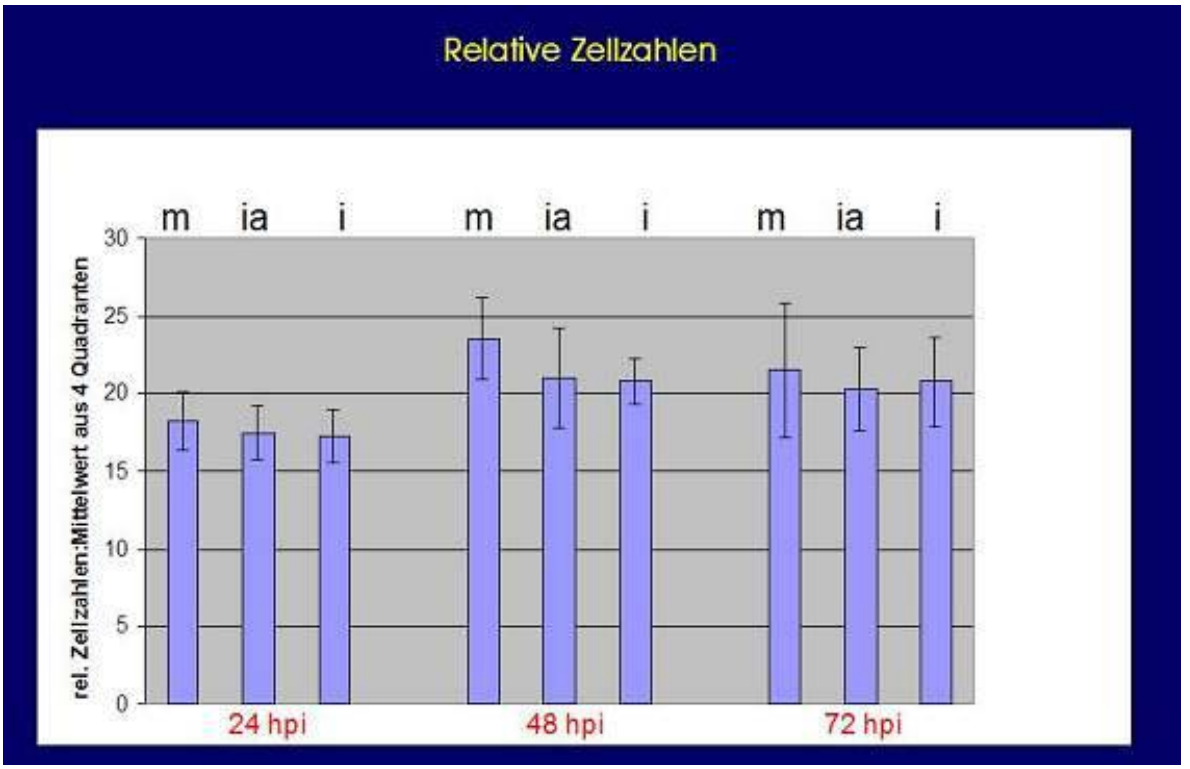


Abbildung 14: Relative Zellzahlen der Zymographieexperimente in Abhängigkeit von Infektionsstatus und Infektionsdauer

m = mit mock-Lösung inokuliert
ia = mit UV-inaktivierten Viren inokuliert
i = mit Laborstamm AD 169 infiziert hpi = „hours post infection“ → Stunden nach Infektion
Das Balkendiagramm stellt die Mittelwerte (n=4) der relativen Zellzahl dar. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Gezählt wurde jeweils in allen vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer - aus mehreren Zählungen wurde dann der Mittelwert gebildet. Wie man sieht, bleibt die Zellzahl ungefähr gleich, egal ob die Zellen mock-infiziert, mit inaktivierten Viren in Kontakt gebracht oder mit AD169 infiziert wurden. Der leichte Anstieg der Mittelwerte ist am ehesten darauf zurückzuführen, daß die Zellen initial nach Aussaat nicht einen geschlossenen Zellrasen bildeten - eine Vermehrung der Zellen war somit noch möglich.

Zwar färbten sich vitale, d.h. sich an der Proteinproduktion sich beteiligende, Zellen im Gegensatz zu toten Zellen blau an, jedoch ließ sich nicht diskriminieren zwischen Zellen, die erst durch den Erntevorgang starben, sich jedoch zuvor an der Proteinproduktion und Sekretion in die Überstände beteiligten, und Zellen die bereits länger abgestorben waren und dadurch nicht an der Proteinproduktion teilnahmen.

Deshalb wurde aus den geernteten Zellen ein Western-Blot gefertigt s., welcher mit Vimentin hybridisiert wurde – ebenfalls ein Housekeeping-Protein, dessen Produktion lt. Literatur nicht durch eine HCMV-Infektion beeinflusst wird. Die genaue Durchführung der Western-Blot-Experimente ist unter 3.3.2.19 geschildert.

4.3.3 Ergebnisse des Western-Blot mit Vimentin:

Mit dem Western-Blot läßt sich die Regulation von Genen auf der Ebene der Protein-Expression untersuchen. In den von uns durchgeführten Experimenten wurde diese Methode zur Messung der Expression von Vimentin jeweils in mock-Lösung behandelter, mit AD 169 infizierten HFF's aus Zell-Lysate der Zellen genutzt, aus deren Kulturüberständen später die Enzymaktivtäten mittels Zymographie ermittelt wurden. Durch Korrelation der Vimentin-Western-Ergebnisse einerseits und der aus den jeweiligen Kulturüberständen durchgeführten Zymographie andererseits konnte ausgeschlossen werden, daß eine Änderung der Enzymaktivität nur auf einer durch verminderte Zellzahl allgemein verringerte Menge der Gesamtproteinproduktion beruht.

Es wurde dazu die Bandenstärke des Vimentin-Western-Blottes mit den entsprechenden Banden der Zymographie (s. 4.3.1) verglichen, um so Unterschiede in der Zellzahl und der daraus resultierenden differenten Synthese der Gesamtproteinmenge und speziell der MMP - Proteine festzustellen.

Durch den Western-Blot mit Vimentin hatte man quasi ein Maß für die Quantität der vitalen Zellen welche sich an der Protein- bzw. Enzymproduktion beteiligen konnten. Daß diese durch den Vorgang der Infektion nicht entscheidend beeinflusst wird, zeigt der im Folgenden dargestellte, mit Antikörpern gegen Vimentin gefertigte Western-Blot (s.**Abbildung 15**)

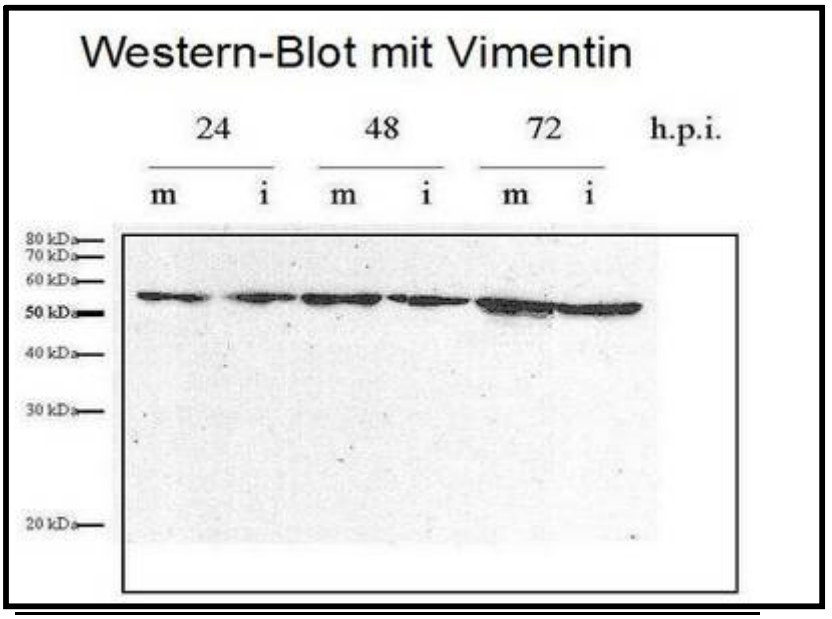


Abbildung 15: Western-Blot – Antikörperreaktion mit Vimentin

m = mit mock-Lösung inokuliert
i = mit Laborstamm AD 169 infiziert
kDa = Kilodalton
hpi = „hours post infection“ → Stunden nach Infektion

Zur Fertigung des Western-Blot wurden die Zellen verwendet, deren Kulturüberstände man zu den Zymographien eingesetzt hatte.

Durch die Antigen-Antikörperreaktion mit Vimentin, welches ein sog. Housekeeping-Protein darstellt, dessen Expression nicht durch eine HCMV-Infektion beeinflusst werden soll, sollte quasi ein Maß für die Produktion von Gesamtprotein in den jeweiligen Zellen geschaffen werden.

Wie schon bei der Zellzahl-Zählung (s.o.) fällt insgesamt eine Zunahme der Vimentin-Menge im Verlauf von 24h.p.i. bis 72 h.p.i. auf, was am ehesten auf eine Erhöhung der Zellzahl zurückzuführen ist (vgl. **Abbildung 14**).

Vergleicht man jedoch die Vimentin-Menge in mock-infizierten mit der in mit AD169 infizierten Zellen, so fällt allenfalls eine sehr diskrete Abnahme der Vimentin-Expression in den AD169-infizierten Zellen gegenüber der in mock-infizierten Zellen auf.

Zusammenfassend zeigt sich also eine gewisse Diskrepanz beim Vergleich mock-infizierter Zellen mit AD 169-infizierten Zellen zwischen verstärkter Aktivierung der MMP-2 auf Promotor-Ebene einerseits und einer reduzierten Transkription und Enzymaktivität der MMP-2 andererseits.

5 Diskussion

5.1 Einordnung der Ergebnisse über die MMP-2-Regulation in Gesamtzusammenhang der Regulation von Wirtszellproteinen infolge einer HCMV-Infektion

Durch elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß es im Laufe einer HCMV-Infektion in der Zellkultur von HFF- und SMC - Zellen zu einem Verlust an fibrillären Proteinen sowie bestimmten sog. Ankerproteinen in der extrazellulären Matrix kommt. So zeigt sich nach einer HCMV-Infektion im Northern-Blot ein völliger m-RNA-Verlust im Falle des Tenascin – auch bei Kollagen I, Decorin und Fibronectin kommt es zu einer bis zu 3-fachen Verminderung der m-RNA-Menge (Schaarschmidt 2000; Reinhardt et al. 2006). Ob sich dieser Verlust eher auf eine verminderte Syntheserate gründet oder auf einer Degradation dieser Proteine basiert war dabei bisher nicht eindeutig geklärt. Bei den Ab- und Umbauvorgängen der ECM spielen sog. Matrix-Metalloproteinasen eine entscheidende Rolle (Endo et al. 1993). Mittlerweile sind viele dieser Matrix-Metalloproteinasen bekannt, welche sich an den Umbauvorgängen der ECM beteiligen. Über die wichtigsten Vertreter sowie deren genauen Funktionen wurde bereits in der Einleitung ausführlich referiert. Eine entscheidende Rolle in bei diesen Umbauvorgängen spielt die MMP-2, wegen ihrer Substratspezifität gegenüber denaturiertem Kollagen III (=Gelatine) auch Gelatinase A genannt (Endo et al. 1993; Liotta et al 1981; Salo et al 1983; Collier et al 1989).

In dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss einer HCMV-Infektion auf die MMP-2 - Genexpression der Wirtszelle sowie deren Aktivität am Beispiel einer HFF-Zellkultur untersucht.

Die Regulation auf Promotor-Ebene wurde dabei mittels eines Promotor-Reporter-Gen-Konstruktes im Luciferase-Assay untersucht.

Die hierbei gewonnenen Daten ergaben, daß es durch eine HCMV-Infektion in den HFF-Zellen zu einer starken Stimulation des MMP-2-Promotors kam. Dieses Phänomen einer massiven Promotor-Stimulation durch eine HCMV-Infektion kannte man jedoch bereits aus vielen anderen Experimenten – anscheinend führt eine HCMV-Infektion wahrscheinlich eher unspezifisch zu einer breiten Stimulation vieler Promotoren zellulärer Proteine (Zhu et al 1998; Schaarschmidt 2000) . Bereits bekannt ist, daß Proteine der Virushülle wie z.B. gB und gH über Induktion der Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF-Kappa-B regulatorisch auf zelluläre Promotoren wirken und dadurch die zelluläre Transkription und die Proteinexpression beeinflussen können (Yoruchko et al. 1995, Yoruchko, Hwang et al. 1997; Yoruchko, Mayo et al. 1997). Auch weiß man, daß das Tegumentprotein pp 71 ebenfalls über Transaktivierung verschiedener zellulärer und viraler Promotoren an der Regulation zellulärer beteiligt ist (Liu&Stinski 1992).Vor allem bezüglich des Transkriptionsfaktor SP1, für welchen es auch auf der Promotor-Sequenz der MMP-2 zwei Bindungstellen gibt konnte beobachtet werden, daß dessen m-RNA, Proteinexpression und DNA-Bindungsfähigkeit durch einen HCMV-Infektion gesteigert wird (Yoruchko, Mayo et al. 1997). Über eine Aktivierung von NF-Kappa-B und E2F wird die Bildung von den viralen Proteinen gB und gH induziert, weshalb diese früh nach Infektion nachweisbar sind (Verechia et al. 2001, Yoruchko, Hwang et al. 1997).

Es wurden deshalb ebenfalls Experimente zur Untersuchung der Regulation der MMP-2 auf Transkriptionsebene durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß es nach einer HCMV – Infektion es zu einer deutlichen Abnahme der MMP-2-m-RNA – Menge kam. Der Effekt einer reduzierten Transkriptionsrate der MMP-2 zeigte sich bereits nach 24 h, deutlicher jedoch nach 48 h nach Infektion, wohingegen die m-RNA – Menge bei der GAPDH-Kontrolle in etwa gleich blieb.
Synoptisch zeigte sich somit im Northern-Blot eine spezifische Herabregulation der MMP-2-Transkription in Abhängigkeit der Dauer der Infektion.
Die Abnahme der Transkriptionsrate zellulärer Proteine infolge einer HCMV-Infektion vor allem in der späten Phase ist ebenfalls ein oft gesehenes Phänomen. Bereits die Untersuchungen von Schaarschmidt (Schaarschmidt 2000) zeigten eine Herabregulation einiger wichtiger Proteine der ECM in der späten Phase der Replikation, während es in der frühen Phase (6-12h) eher zu einer Stimulation der

Transkription dieser Proteine kam (Watanbe et al 1999; Mocarski 1996; Schaarschmidt 2000; Zhu et al 1998).

Jedoch zeigten die Northern-Blot-Untersuchungen ebenfalls eine sichtbare, aber deutlich geringere Abnahme der m-RNA-Menge, wenn die Zellen mit UV-inaktiviertem Virus inokuliert wurden. Diese Herabregulation von zellulären Proteinen nach einer HCMV-Infektion auch durch Inokulation der HFF-Zellen mit UV-inaktiviertem Virus konnte auch in den von Schaarschmidt durchgeführten Experimenten bei Untersuchungen der m-RNA-Mengen von VEGF und Kollagen I nachgewiesen werden (Schaarschmidt 2000).
Die Abnahme der Transkriptionsrate kann einerseits eine echte Folge der Infektion der Wirtszelle mit HCMV sein, andererseits kann diese Beobachtung im Experiment auch auf einen systematischen Fehler gründen – z.B. könnte es sich um eine sehr instabile RNA handeln, welche sofort nach Transkription wieder abgebaut und so in unseren Northern-Blot-Experimenten nicht detektiert wird. Ein weiteres systematisches Problem könnte sein, daß man bei den Experimenten mit aus dem Gesamtgenom isolierten Gen-Sequenzen arbeitet - bestimmte im Gesamtgenom wirksamen Regulationsmechanismen könnten bei diesen isolierten Genabschnitten unwirksam oder in anderer Weise wirksam sein.

Um die Regulation der MMP-2 auf Proteinebene zu untersuchen, wählten wir mit der Zymographie eine Methode, mit der man die Aktivität der MMP-2 untersuchen konnte.
Wie bereits in der Einleitung referiert, ist die Regulation der MMP's äußerst komplex, deshalb wird im Folgenden nochmals genauer über deren Regulationsmechanismen referiert.
Es ist leicht verständlich das eine Enzymgruppe wie die MMP's, die zwar für Um- und Abbauvorgänge der ECM sehr nützlich, aber andererseits durch ihre destruktive Kraft sehr gefährlich für den Organismus werden kann, einer sehr genauen Kontrolle ihrer Aktivität unterliegt. Bis auf wenige Ausnahmen werden die MMP's nie länger in der Zelle gespeichert, sondern nur bei Bedarf produziert und sezerniert (Woessner 1991).

Prinzipiell erfolgt die Regulation der MMP-Produktion bzw. - Aktivität auf drei Ebenen(Docherty et al. 1992):

- auf Transkriptionskriptionsebene wird die Produktion von MMP's v.a. durch Aktivierung oder Hemmung der Promotoren aktiviert. Zum Beispiel wirkt TGF*ß*-1 durch Promotorbeeinflussung auf die Expression von MMP-1 hemmend, auf die Expression von MMP-2 stimulierend (Woessner 1991; Overall et al 1991; Salo et al. 1991).
- Die MMP's kommen extrazellulär hauptsächlich im Komplex mit sog. Tissue Inhibitors of Metallo-Proteinases (TIMP's) vor, welche sie in ihrer Aktivität mehr oder weniger spezifisch hemmen(Docherty et al. 1992).
  Darüber hinaus ist auch alpha2-Makroglobulin als solcher Hemmstoff beschrieben worden (Arthur 1990; Woessner 1991).
- von den Zellen werden die MMP's in zunächst inaktiver Zymogen- bzw. Proenzymform sezerniert. Erst durch proteolytische Spaltung (auch autokatalytisch) wird oder durch Konformationsänderung, dem sog. Cystein-Switch (s.u.) entsteht die aktive Form des Enzyms (Woessner 1991; Van Wart u. Birkedal- Hansen 1990).

<u>Cystein-Switch:</u>

In latenter Form besteht innerhalb des jeweiligen MMP-Moleküls eine Interaktion bzw. eine Bindung zwischen dem Cysteinrest einerseits und dem katalytischen Zink-Atom andererseits. Eine Unterbrechung dieser Bindung führt über eine Konformationsänderung mit Distanzierung des Cysteinrestes gegenüber dem katalytischen Zinkatom zur Freilegung des aktiven Zentrums und so zur Aktivierung des Enzyms. Verschiedene Substanzen wie organische Quecksilberverbindungen (z.B. pAPMA), oberflächenaktive Substanzen wie SDS oder chaotrope Substanzen wie NaSCN können über verschiedene Mechanismen zu einer solchen Konformationsänderung und dadurch zur Enzymaktivierung führen (Woessner 1991; Van Wart u. Birkedal-Hansen 1990; Collier et al. 1988; Murphy et al. 1985; Birkedal-Hansen u. Taylor 1982).

Zuletzt wurde Darüber hinaus mit EMMPRIN (=extracellular matrix metalloproteinase inducer) ein Induktor der MMP's entdeckt, welchem ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Regulation der MMP's zugesprochen wird (Biswas 1982; Davidson et al. 2002; Haug et al. 2004).

Bei der Zymographie befinden sich die MMP's während des Gellaufs durch Denaturierung mit SDS in denaturiertem, also inaktivem Zustand, durch Renaturierung mittels Triton X wird das Enzym in die aktive Form übergeführt.

Durch diesen methodischen Trick kann bei der Zymographie sichergestellt werden, daß ein Großteil des vorhandenen Enzyms auch wirklich in aktiver Form vorliegt.
In den von uns durchgeführten Experimenten, in welchen jeweils Überstände von mock- oder HCMV-infizierten HFF-Zellen nach 6h, 24h, 48h und 72h post-infectionem untersucht wurden, zeigte sich analog zu den Ergebnissen im Northern-Blot eine Abnahme der MMP-2-Aktivität in den Überständen der mit AD 169 infizierten Zellen, wohingegen die Aktivität in mock-infizierten Zellen initial leicht zunahm später in etwa gleich blieb. In frühen Phasen der Virus-Replikation war dieser Effekt zunächst nur sehr diskret zu sehen, eine deutlichere Abnahme der MMP-2-Aktivität sah man jedoch nach 48h und 72h. Auch hier scheint also eine Downregulation der MMP-2-Aktivität in Abhängigkeit der Dauer der Infektion vorzuliegen
Da die Aktivität der MMP-2 maßgeblich von deren Quantität und damit von der Zahl der das Enzym produzierenden Zellen abhängt, wurde additiv ein Western-Blot für Vimentin durchgeführt. Vimentin wird als Intermediär-Filament konstitutiv in HFF-Zellen produziert und soll in seiner Produktion durch eine HCMV-Infektion weitgehend unbeeinflusst bleiben. Indem man die Lysate der Zellen, deren Überstände man später zur Zymographie einsetzte, im Rahmen des Western-Blottes mit Vimentin-Antikörper reagieren ließ, hatte man somit einen Maßstab für die Produktion des Gesamt-Protein in den Zellen. Weiterhin wurde eine Zählung der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer durchgeführt.
Sowohl in der Zell-Zählung als auch im Vimentin-Western-Blot zeigte sich, daß weder die Zellzahl noch die Menge des Proteins Vimentin, welche mit der Gesamt-

Protein-Menge korreliert, sich nennenswert durch den Einfluß einer HCMV-Virus-Infektion verringerte.

Somit dürfte die Abnahme der MMP-2-Aktivität in den Zellkultur-Überständen als spezifische Reaktion der HFF-Zellen auf die Infektion mit CMV gelten und nicht durch eine allgemeine Verminderung der Gesamtproteinsynthese bedingt sein und das obwohl auch die MMP-2 in Fibroblasten eine konstitutive Aktivität besitzt und damit als sogenanntes Housekeeping-Enzym zu gelten hat (Huhtala, Eddy et al. 1990; Goldberg et al. 1989; Brown, Kleiner et al. 1993).

In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigt sich auf Promotorebene eine starke Stimulation des MMP-2-Gens. Wie bereits erwähnt, ist die Stimulation eines Promotors durch eine HCMV-Infektion ein auch bei vielen anderen Genprodukten gesehenes Phänomen, nur selten spiegelt sich diese z.T. massive Stimulierung auch in einer vermehrten Transkription wieder. Weshalb in vitro eine so starke Promotor-Stimulation nicht auch zu einer erhöhten Transkriptionsrate führt bleibt ungeklärt.

Sicherlich ein wichtiger Aspekt dabei ist, daß es sich bei den Promotor-Untersuchungen *in vitro* um vom Gesamt-Genom isolierte Sequenzen auf einem Plasmid handelt, wohingegen die Northern-Blot-Experimente quasi die Verhältnisse *in vivo* untersuchen. So könnten für die MMP-2-Expression *in vivo* regulatorisch (evtl. transkriptions- und translationshemmend) wirkende Regionen im Reporter-Gen-Konstrukt nicht miterfasst sein.

Eine andere Erklärung für die Diskrepanz zwischen Promotor-Stimulierung einerseits und Hemmung der Transkription andererseits ist, daß bei dem Vorgang der Infektion viele andere Einflüsse eine Rolle spielen.

So könnte es zum Beispiel zur Aktivierung anderer zellulärer Gene durch die Infektion kommen, die die Transkription der MMP-2 trotz Promotoraktivierung unterbinden. Auch könnten andere virale Gene direkt eine Suppression der MMP-2-Transkriptinsrate bewirken. Vorstellbar wäre auch, daß die mit HCMV infizierte Zelle im Verlauf der Infektion den Schwerpunkt ihrer Synthese auf Genprodukte verlagert, welche sie essentiell zum Überleben braucht.

Wie auch bei anderen ECM-Proteinen beobachtet, bewirkt eine HCMV-Infektion auch im Falle des MMP-2-Gens eine Verminderung der Transkriptionsrate. Die Ergebnisse der Zymographie zeigen außerdem, daß es auch auf der Proteinebene bzw. auf der Ebene des aktiven Enzyms zu einer Verminderung der MMP-2-Aktivität kommt.

Dies lässt den Schluß zu, daß zumindest in vitro die MMP-2 keine entscheidende Rolle an der Degradation der ECM nach einer HCMV-Infektion in HFF-Zellen spielen dürfte.

Insgesamt stellt die MMP-2 verglichen mit anderen MMP's in ihrer Regulation eine Besonderheit dar. Da diese, vor allem in vivo zu berücksichtigende, spezielle Regulation wichtig für das Gesamtverständnis ist und zur besseren Einordnung unserer Ergebnisse in den allgemeinen Kontext dient, soll auf diese kurz eingegangen werden:
Wie unter 1.4.1.2 erwähnt, ist die MMP-2 im Gegensatz zu vielen anderen Matrix-Metalloproteinasen v.a. in Fibroblasten konstitutiv aktiv. Die MMP-2 wird in in Zymogen- bzw. Proenzymform sezerniert. Meist findet man sie dann im Komplex mit ihrem Inhibitor TIMP-2 (Stetler-Stevenson et al. 1989). Zur Aktivierung ist eine Konformationsänderung zur Freilegung des aktiven Zentrums nötig. Im Unterschied zu den anderen Matrix-Metalloproteinasen kann diese Aktivierung nicht durch Serin-Proteasen wie Plasmin, Kallikrein oder Trypsin erfolgen (Goldberg et al. 1989; Okada et al. 1990). Im Falle der MMP-2 wurde ein spezifischer Aktivator gefunden (Sato et al. 1994): die MT1-MMP(MMP-14), ein 63 kDa Protein, welches in den Membranen verschiedener Zellen sich befindet und dort als Rezeptor und Aktivator für das MMP-2-Proenzym bzw. des MMP-2-Proenzym - TIMP-2 - Komplexes dient (Kinoshita et al. 1996). Klinische Relevanz erhält dieser Umstand dadurch, daß durch die membranständige MT1-MMP erzielte Aktivierung des MMP-2-Proenzyms als sehr wichtiger Schritt bei der Invasion eines Tumors angesehen wird (Sato et al. 1994). Auch die MT1-MMP soll selektiv durch TIMP-2 inhibiert werden(Sato et al. 1996). Es scheint also, daß das Zusammenspiel der Moleküle MT1-MMP, MMP-2-Proenzym sowie TIMP-2, welche in einem Trimer-Komplex vorliegen, für die Regulation der MMP-2-Aktivität entscheidend ist. (Kanwar et al. 1999; Strongin et al. 1995; Stetler-Stevenson et al. 1989; Butler et al. 1998). Die genaue Regulation ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

5.2 Mögliche andere Ursachen für Abnahme der ECM

Zwar scheint die MMP-2 insgesamt eher keine entscheidende Rolle in der aktiven Degradation der ECM nach einer HCMV-Infektion in der HFF-Kultur zu spielen. Da neben der MMP-2 aber auch noch zahlreiche andere Matrix-Metalloproteinasen bei den Umbauvorgängen der ECM mitwirken, sollte auch deren Regulation untersucht werden.

Sollte sich auch bei den anderen Vertretern der MMP's jeweils keine wesentliche Hochregulation zeigen, muß erneut die Frage gestellt werden:

Handelt es sich bei dem im Falle der HFF-Zellen nach einer HCMV-Infektion gesehenem Phänomen der Verminderung der extrazellulären Matrix wirklich um einen Vorgang der aktiven Degradation oder kommt es nach einer Infektion und damit im Verlauf der Virusreplikation zu einer Verminderung der Synthese der ECM-Proteine?

Die Struktur der ECM unterliegt, wie bereits referiert, vielerlei Einflüssen und Regulationsmechanismen - insgesamt befindet sich die Matrix in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau.

Es scheint auch durchaus denkbar, daß es durch eine Infektion der HFF durch das humane Zytomegalievirus in den Zellen bereits frühzeitig zu einer Verminderung der Syntheserate der ECM-Proteine kommt, welche so dem hohen Turn-over der ECM nicht mehr gerecht werden kann. Letztlich kann es dann auch auf diese Weise zu einer Verminderung der ECM-Fasern kommen.

5.3 Unterschiede in der MMP-2-Regulation unter dem Einfluß einer HCMV-Infektion in Abhängigkeit von der Zellart

Einen Hinweis darauf, daß die Verminderung der verschiedenen ECM-Proteine und der an der Regulation der ECM beteiligten Enzyme kein genereller Effekt einer HCMV-Infektion durch Zellschädigung ist, gewann man durch Untersuchungen an anderen Zellen. So konnte z.B. bei glatten Muskelzellen (smooth muscular cells=SMC's) neben einer Hochregulation des ECM-Proteins VEGF und des PDGF-Rezeptor eine deutliche Steigerung der MMP-2 Aktivität bei

gleichzeitig ausgeprägter Verminderung verschiedener anderer ECM-Proteine gefunden werden (Reinhardt et al 2006).
Durch eine Zugabe von EDTA, welches als Inhibitor von MMP's bekannt ist, zeigte sich im Falle der SMC nach einer HCMV-Infektion keine Abnahme von Kollagen-I, wohingegen im Falle von HFF-Zellen die Zugabe von EDTA die Verminderung von Kollagen I nach HCMV-Infektion nicht verhindern konnte. Weiter zeigte sich im Gegensatz zu den Experimenten in der HFF-Zellkultur am Beispiel einer SMC-Zellkultur sowohl eine 3-fache Zunahme der MMP-2-Proteinmenge im ELISA, als auch eine erhöhte MMP-2-Aktivitiät in der Zymographie. In der HFF-Kultur sah man dagegen parallel zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten eine Abnahme der MMP-2-Aktivität in der Zymographie sowie eine 70-80% Abnahme der Menge an MMP-2-Protein in ELISA (Reinhardt et al 2006).

Es läßt sich daraus schließen, daß im Falle der SMC's es sehr wohl einen aktiven Kollagen-Abbau durch MMP's geben muß. Bei HFF-Zellen scheint die Verminderung von Kollagen dagegen nicht in einem aktiven Abbau durch MMP's begründet zu sein (Reinhardt et al. 2006).
Da SMC's zu den Hauptbestandteilen der Blutgefäße gehören, damit wichtig für deren Textur sind (Brooke et al. 2003) und es durch diese Umbauvorgänge zu einer bindegewebigen Umwandlung der Gefäßtextur kommen kann, wird ein Zusammenhang zwischen einer HCMV-Infektion und der vermehrten Atherosklerose entstehung eben über diesen Mechanismus vermutet (Reinhardt et al 2006).

6 Zusammenfassung

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) verursacht in Zellkulturen zytopathischen Effekt. Die genauen Mechanismen, welche zu diesem Effekt und schließlich zum Absterben der Wirtszelle führen sind bisher nur wenig erforscht. Es wurde jedoch beobachtet daß es offenbar nach Infektion zu einem Verlust von Fasern der extrazellulären Matrix kommt. Eine wichtige Funktion bei den Um- und Abbauvorgängen der extrazellulären Matrix spielt dabei die Enzymgruppe der Matrix-Metalloproteinasen.

Ziel dieser Arbeit war deshalb, zu untersuchen, ob es evtl. nach einer HCMV-Infektion über die Beeinflussung von Matrix-Metalloproteinasen zu einem Verlust an Fasern kommt. Aufgrund ihres großen Vorkommens und Ihrer Wichtigkeit in den Remodelling-Vorgängen der extrazellulären Matrix wurde in den Experimenten die Beeinflussung durch eine Zytomegalievirus-Infektion am Beispiel der Matrix-Metalloproteinase in der Zellkultur mit humanen Vorhautfibroblasten (HFF) untersucht.

Die Beeinflussung der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) nach Zytomegalievirus-Infektion wurde dabei auf Promotor-Ebene durch einen Luciferase–Assay, auf m-RNA-Ebene durch Northern-Blot, auf Enyzmebene durch die Zymographie untersucht. Sowohl auf m-RNA-Ebenen als auch auf Enzymebene scheint jedoch eine Infektion durch das humane Zytomegalievirus (HCMV) eher eine Verringerung der transkribierten MMP-2-m-RNA- Menge bzw. der MMP-2-Aktivität zu verursachen. Wie bereits bei anderen untersuchten Proteinen fand sich auch in den von uns durchgeführten Experimenten am Beispiel der MMP-2 eine Diskrepanz zwischen einer in vitro sehr starken Promotor-Stimulation einerseits und einer verminderten Transkriptionsrate und - auf Proteinebene - einer verminderten Enzymaktivität andererseits. Da die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen und speziell der MMP-2 v.a. in vivo nicht nur von der synthetisierten Menge abhängt, sondern einer komplexen Regulation unterliegt, wurde auf diese Regulationsmechanismen kurz eingegangen. Obwohl die in unseren Experimenten gesehenen Ergebnisse aufgrund dieser komplexen Regulationsmechanismen nicht ohne weiteres auf die Vorgänge in vivo

übertragbar sein dürften, scheint jedoch zumindest in der HFF-Kultur die MMP-2 nicht am aktiven Abbau von Fasern nach einer HCMV-Infektion beteiligt zu sein.
Ursache für diesen Faserverlust könnte also in der HFF-Kultur entweder die Hochregulation anderer Matrix-Metalloproteinasen oder ein Mangel an ECM-Proteinsynthese sein.
Dass die MMP-2 evtl. eine Rolle im aktiven Faserabbau und damit am zytopathischen Effekt in anderen Zellen spielt, zeigen fast analog zu unseren Experimenten durchgeführte Untersuchungen an glatten Muskelzellen (smooth-muscelcells=SMC's), bei welchen es durch eine HCMV-Infektion zu einer deutlichen Hochregulation der MMP-2 kommt. Diese Tatsache besitzt durchaus eine klinische Relevanz, da eine erhöhte MMP-2-Aktivität in SMC's auch mit den pathophysiologischen Vorgängen bei der Arterioskleroseentstehung in Verbindung gebracht wird – eine CMV-Infektion könnte also über diesen Mechanismus die Arteriosklerose in Gefäßen fördern.

7 Literaturverzeichnis

1. Arthur, M.J.P.
Matrix degradation in the liver
Semin. Liver Dis. 10: 20-29. (1990)

2. Aumailley, M. und Gayraud, B.
Structure and biological activity of the extracellular matrix
J. Mol. Med. 76: 253-265. (1998)

3. Becker, J.W.; Marcy, A.I.; Rokosz, L.L.; Axel, M.G.; Burbaum, J.J.; Fitzgerald, P.M.; Cameron, P.M.; Esser, C.K.; Hagmann, W.K.; Hermes, J.D. und Springer J.P.
Stromelysin-1: three-dimensional structure of the inhibited catalytic domain and of the C-truncated proenzyme.
Protein Sci. 4: 1966-1976. (1995)

4. Becroft, D.M.
Prenatal cytomegalovirus infection: epidemiology, pathology and pathogenesis.
Perspect. Pediatr. Pathol., 6: 203-241. (1981)

5. Behrendtsen, O. und Werb, Z.
Metalloproteinases regulate parietal endoderm differentiating and migrating in cultured mouse embryos.
Develop. Dyn. 208: 255-265. (1997)

6. Birkedal-Hansen, H.
Proteolytic remodeling of extracellular matrix.
Curr.Opin.Cell Biol. 7: 728-735. (1995)

7. Birkedal-Hansen, H. und Taylor, R.E.
Detergent-activation of latent collagenase and resolution of its component molecules.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 107: 1173-1178. (1982)

8. Birkedal-Hansen, H.; W.G.I. Moore, M.K.; Bodden, L.J.; Windsor, B.
Matrix Metalloproteinases: a review.
Crit.Rev.Oral Biol.Med. 4: 197-250. (1992)

9. Biswas C.
Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 15; 109:1026-34. (1982)

10. Bresnahan, W.A: ; Boldogh, I.; Thompson, E.A. und Albrecht, T.
Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1.
Virology, 224: 150-160. (1996)

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

12. Borkakoti, N.
Matrix metalloproteases: variations on a theme
Prog. Biophys. Mol. Biol. 70: 73-94. (1998)

13. Brooke, B.S.; Karnik, S.K. und Li, D.Y.
Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal.
Trends Cell. Biol. 13: 51-56. (2003)

14. Brooks, P.C.; Stromblad, S.; Sanders, L.C.; von Schalcha, T.L.; Aimes, R.T.; Stetler-stevenson, W.G.; Quigley, J.P. und Cheresh, D.A.
Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3
Cell 85: 683-693. (1996)

15. Brown, P.D.; Bloxidge, R.E.; Stuart, N.S.A.; Gatter, K.C. und Carmichael, J.
Association betwen expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in small-cell lung carcinoma.
J. nat. Cancer Inst. 85: 574-578. (1993)

16. Brown, P.D.; Kleiner, D.E.; Unsworth, E.J. undStetler-Stevenson, W.G.
Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex.
Kidney Int. 43: 163-170. (1993)

17. Burgeson R.E. & Nimni M.E.
Collagen types. Molecular structure and tissue distribution
Clin. Orthop. 250-272. (1992)

18. Butler, G.S.; Butler, M.J.; Atkinson, S.J.; Will, H.; Tamura, T.; van Westrum, S.S.; Crabbe, T.; Clements, J.; d'Ortho, M.P. und Murphy, G.
The TIMP2 membrane type 2 metalloproteinase “receptor” regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study.
J. Biol. Chem.273: 871-880. (1998)

19. Chen, R.; Xiong, S.; Yang, Y.; Fu, W.; Wang, Y. und Ge, J.
The relationship between human cytomegalovirus infection and atherosclerosis development.
Mol. Cell. Biochem. 249: 91-96. (2003)

20. Cohen, S. N., Chang A. C. Y. und Hsa, L.
Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110-2114. (1972)

21. Collier, I.E.; Wilhelm, S.M.; Eisen, A.Z.; Marmer, B.L., Grant, G.A.; Seltzer, J.L.; Kronberger, A.; He, C.; Bauer, E.A. und Goldberg, G.I.
H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen.
J. Biol.Chem. 263: 6579-6587. (1988)

22. Compton, T.; Nowlin, D. M. und Cooper, N.R.
Initiation of Human Cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate.
Virology 1993: 834-841. (1993)

23. Davidson, B.; Reich, R.; Risberg, B.; Nesland, J.M.
The biological role and regulation of matrix metalloproteinases (MMP) in cancer.
Arkhiv Patologii 64: 47-53. (2002)

24. Degre, M.
Has cytomegalovirus infection any role in the development of atherosclerosis?
Clin. Microbiol. Infect. 8: 191-195. (2002)

25. Dittmer, D. und Mocarski, E.S.
Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition.
J. Virol. 71: 1629-1634. (1997)

26. Docherty, A.J.; O'Connell, J.; Crabbe, T.; Anal, S. und Murphy, G.
The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases.
Trends Biotechnol. 10: 200-207.(1992)

27. Ellenrieder, V.; Alber, B.; Lacher, U.; Hendler, S.F.; Menke, A.; Boeck, W.; Wagner, M.; Wilda, M.; Friess, H.; Büchler, M.; Adler, G. und Gress, T.M.
Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression.
Int. J. Cancer 85: 14-20. (2000)

28. Endo , T.; Aten, R.F., Wang, F. & Behrman H.R.
Coordinate induction and activation of metalloproteinase and ascorbate depletion in strucural lutolysis.
Endocrinology 133: 690-698. (1993)

29. Farrell, H.E. und Shellam, G.R.
Protection against murine cytomegalovirus infection by passive transfer of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies.
J. Gen. Virol. 72: 149-165. (1991)

30. Fernandez-Patron, C.; Martinez-Cuesta, M.A.; Salsa, E.; Sawicki, G.; Wozniak, M.; Radomski, M.W. und Davidge, S.T.
Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2.
Thrombosis and Haemostasis 82: 1730-1735. (1999)

31. Fisher, C.; Gilbertson-Beadling, S.; Powers, E.A.; Petzold, G.; Poorman, R. und Mitchell, M.A.
Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro.
Develop. Biol. 162: 499-510. (1994)

32. Garbisa, S.; Ballin, M.; Daga-Giordini, D.; Fastelli, G.; Naturale, M.; Negro, A.; Semenzato, G. und Liotta, L.A.
Transient expression of type IV collagenolytic metalloproteinase by human mononuclear phagocytes
J. Biol. Chem. 261: 2369-2375. (1986)

33. Gianelli, G.; Falk-Marzillier, J.; Schiraldi, O.; Stetler-Stevenson, W.G. und Quaranta, V.
Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5.
Science 277: 225-228. (1997)

34. Girard, M.; Cleroux, P.; Tremblay, P.; Dea; S. und St. Pierre, Y.
Increased proteolytic activity and matrix metalloprotease expression in lungs during infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus.
J.Gen.Virology 82: 1253-1261. (2001)

35. Glenn, J.
Cytomegalovirus infections following renal transplatation.
Rev. Infect. Dis. 3: 1151-1178. (1981)

36. Goldberg, G.I.; Marmer, B.L.; Grant, G.A.; Eisen, A.Z.; Wilhelm, S. und He, C.
Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2.
Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 8207-8211. (1989)

37. Gross, J. und Lapiere, C.M.
Collagenolytic activity in amphibien tissues: A tissue culture assay.
Proc. Natl. Acad. Sci. 48: 1014-1022. (1962)

38. Gupta, P., Joer, S. & Rapp, F.
Comparison of the poypeptides of several stains of Human Cytomegalovirus.
J. Gen. Virol. 34: 447-454. (1977)

39. Hampl, W.; Michel, D. ; Mertens T.
Die HCMV-erkrankung bei AIDS: Klinisches Erscheinungsbild, Diagnostik und Therapie.
In W. Heise (Hrsg.), Die CMV-Erkrankung Klinisches Erscheinungsspektrum, Diagnostik und Therapie. Erlangen: Pharmacia&Upjohn GmbH. S. 7-36. (1998)

40. Hanshaw, J.B.
Congenital cytomegalovirus infection: a fifteen years perspective.
J. Infect. Dis. 123: 555-561 (1971)

41. Haug, C.; Lenz, C.; Diaz, F.; Bachem, M.G.
Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24: 1823-1829. (2004)

42. Hertenstein, B.; Hampl, B.; Bunjes, D.; Wiesneth, M.; Duncker, C.; Koszinowski, U.; Heimpel, H.; Arnold, R.; Mertens, T.
In vivo /ex vivo T cell depeletion for GVHD prophylaxis influences onset an course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT
Bone Marrow Transplant., 15: 387-393. (1995)

43. Heussen, C. und Dowdle, E.B.
Electrophoresic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing SDS and copolymerized substrates.
Anal. Biochem. 102: 196-202. (1980)

44. Ho, M.
Cytomegalovirus: biology and infection.
Plenum Press; New York, (1982)

45. Huhtala, P.; Chow, L.T. und Tryggvason, K.
Structure of the Human Type IV Collagenase Gene.
J.Biol.Chem. 265: 11077-11082. (1990)

46. Huhtala, P.; Eddy, R.L.; Fan, Y.S.; Byers, M.G.; Shows, T.B. und Tryggvason, K.
Completion of the primary structure of the human type IV collagenase preproenzyme and assignment of the gene (CLG4) to the q21 region of chromosome 16.
Genomics 6: 554-559. (1990)

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

48. Jacobson , M.A. und Mills, J.
Serious cytomegalovirus disease in the aquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Clinical findings, diagnosis and treatment.
Ann. Intern. Med. 108: 585-594. (1988)

49. Jonjic, S.; Pavic, I.; Polic, B.; Crnkovic, I.; Lucin, P.; Koszinowski, U.H.
Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus.
J. Exp. Med. 179: 1713-1717. (1994)

50. Kalebic, T; Garbisa,, S; Glaser, B. und Liotta, L.A.
Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells.
Science 221: 281-283. (1983)

51. Kanwar, Y.S.;Ota, K.; Yang, Q.; Wada, J.; Kashihara, N.; Tian, Y. und Wallner, E.I.
Role of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT-1-MMP), MMP-2, and its inhibitor in nephrogenesis.
Am. J. Physiol. 277: 934-947. (1999)

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

53. Kinoshita, T.; Sato, H.; Takino, T.; Itoh, M.; Akizawa, T. und Seiki, M.
Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by recombimant membrane-type 1 matrix metalloproteinase.
Cancer Res. 56: 2535-2538. (1996)

54. Kleiner, D.E. und Stetler-Stevenson, W.G.
Quantitative zymographie: detection of picogram quantities of gelatinases.
Anal. Biochem. 218: 325-329. (1994)

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

56. Kräling, B.M.; Wiederschain, D.G.; Boehm, T.; Rehn, M.; Mulliken, J.B. und Moses, M.A.
The role of matrix metalloproteinase activity in the maturation of human capillary endothelial cells in vitro.
J. Cell. Sci. 112: 1599-1609. (1999)

57. Kumagai, K.; Ohno, I.; Okada, S.; Ohkawara, Y.; Suzuki, K.; Shinya, T.; Nagase, H.; Iwata, K. und Shirato, K.
Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma.
J. Immunology 162: 4212-4219. (1999)

58. Liotta, L.A.; Abe, S.; Gehron-Robey, P. und Martin, G.R.
Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 2268-2272. (1979)

59. Liotta, L.A.; Tryggvason, K.; Garbisa, S.; Hart, I.; Foltz, C.M. und Shafie , S.
Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen.
Nature 284: 67-68. (1980)

60. Liotta, L.A.; Tryggvason, K.; Garbisa, S.; Gehron-Robey, P. undAbe, S.
Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen.
Biochemistry 2: 100-104. (1981)

61. Liotta,L.A. und Rao, C.N.
Tumor invasion and metastasis.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 460: 333-344. (1985)

62. Liotta,L.A.; Rao, C.N. und Wewer, U.M.
Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane.
Annu. Rev. Biochem. 55: 1037-1057. (1986)

63. Liotta, L.A.; Steeg, P.S. und Stetler-Stevenson, W.G.
Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.
Cell 64:327-336. (1991)

64. Liu, B. und Stinski, M.F.
Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promotors with with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements.
J. Virol. 66: 4434-4444. (1992)

65. Lu, M. und Shenk, T.
Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 Phase of the cell cycle.
J. Virol. 73: 676-683. (1999)

66. Macher, A. ; Reichert, C.; Straos, S.; Longo, D.; Parillo, J.; Lane, H.; Fauci,A.; Rook, A.; Manischewitz, J. ; Quinnan , G. .
Death in the AIDS patient: Role of Cytomegalovirus.
N. Engl. J. Med. 309: 1454. (1983)

67. Malone, C.L.; Vesole, D.H. und Stinski, M.F.
Transacitvation of a human cytomegalovirus early promotor by gene products from the immediate-early gene IE2 and augmentation by IE1: mutational analysis of the viral proteins.
J. Virol. 64: 1498-1506. (1990)

68. Martignetti, J.A.; Al Aqeel, A.; Al Sewairi, W.; Boumah, C.E.; Kambouris, M.; Al Mayouf, S.; Sheth, K.V.; Al Eid, W.; Dowling, O.; Harris, J.; Glucksman, M.J.; Bahabri, S.; Meyer, B.F. und Desnick, R.J.
Mutation of the matrix metalloproteinase 2 gene (MMP2) causes a multicentric osteolysis and arthritis syndrome.
Nature Genetics 28: 261-265. (2001)

69. McGavran, M.H and Smith, M.G.
Ultrastructural, cytochemical and microchemical observations on cytomegalovirus infection of human cells in tissue culture
Exp. Mol. Pathol. 4: 1-10: (1965)

70. Mertens , T.
Zytomegalievirus (CMV).
In: Haller O.A: & Mertens T. (Hrsg.) Diagnostik und Therapie von Viruskrankheiten, Leitlinien der Gesellschaft für Virologie. München – Jena: Urban & Fischer Verlag. S. 235-240 (1999)

71. Milani, S.; Herbst, H.; Schuppan, D.; Grappone, C.; Pellegrini, G.; Pinzani, M.; Casini, A.; Calabro, A.; Cianco, G.; Stefanini, F.; Burroughs, A.K. und Surrenti, C.
Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and –2 genes in normal and fibrotic human liver.
Am. J. Pathol. 144: 528-537. (1994)

72. Mocarski, E.S.
Cytomegaloviruses an their replication
In Fields B.N.; Knipe D.M. & Howley P.M. (Ed.), Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven. S.2447-2492. (1996)

73. Mörk, S.
Modulation der Apoptose nach Infektion mit humanem Zytomegalievirus (HCMV)
Med. Dissertation, Universität Ulm (2004)

74. Murphy, G.; McAlpine, C.G.; Poll, C.T. und Reynolds, J.J.
Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and type IV and V Collagen.
Biochim. Biophys. Acta 831: 49-58. (1985)

75. Murphy, G. und Hembry, R.M.
Proteinases in rheumatoid arthritis.
J. Rheumatol. Suppl. 32: 61-64. (1992)

76. Okada, Y.; Nagase, H.; Harris, E.D. Jr.
A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization.
J. Biol. Chem. 261: 14245-14255. (1986)

77. Okada, Y.; Morodomi, T.; Enghild, J.J.; Suzuki, K.; Yasui, A.; Nakanishi, I.; Salvesen, G.; und Nagase, H.
Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties.
Europ. J. Biochem. 194: 721-730. (1990)

78. Overall, C.M.; Wrana, J.L. und Sodeck, J.
Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa-gelatinase / type IV collagenase by transforming growth factor- ß -1 in human fibroblasts.
J. Biol.Chem. 266: 14064-14071. (1991)

79. Peress, N.; Perillo, E. und Zucker, S.
Localization of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in Alzheimer's disease and normal brain.
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54:16-22. (1995)

80. Pizzorno, M.C.; O'Hare, P.; Sha, L.; LaFemina, R.L. und Hayward, G.S.
Transactivation and autoregulation of gene expression by the immediate-early region 2 gene products of human cytomegalovirus
J. Virol. 62: 1167-1179. (1988)

81. Radsak, K.; Kern, H.F.; Reis, B.; Reschke, M.; Mockenhaupt, T. und Eickmann, M.
Human cytomegalovirus: Aspects of viral morphogenesis and of processing and transport of viral glycoproteins.
In DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanism. H. Friedman & G. Barbant-Brodano (Hrsg.); New York: Plenum Press. S. 295-312. (1995)

82. Reinhardt, B.; Minisini, R.; Mertens, T.
Opinion article: cytomegalovirus is a risk factor in atherogenesis.
Herpes 9: 21-23 (2002)

83. Reinhardt, B.; Winkler M.; Schaarschmidt, P.; Pretsch R.; Zhou, S.; Vaida B.; Schmid-Kotsas A.; Michel D.; Walther P.; Bachem M.; Mertens T.
Human cytomegalovirus-induced reduction of extracellular matrix proteins in vascular smooth muscle cell cultures: a pathomechanism in vasculopathies?
J. Gen. Virol. 87: 2849-2858. (2006)

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

85. Rubin, R.H. ; Russel, P.S. , Levin, M und Cohen C.
Summary of a workshop on Cytomegalovirus infection during organ transpantation
J. Infect. Dis. 139: 728-734 (1979)

86. Salo, T.; Liotta, L.A. und Tryggvason, K.
Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells.
J. Biol. Chem. 258: 3058-3063. (1983)

87. Salo, T.; Turpeeniemi-Hujanen, T. und Tryggvason, K
Tumor-promoting phorbolesters and cell proliferation stimulte secretion of basement membrane (type IV) collagen-degrading metalloprotteinase by human fibroblasts.
J. Biol. Chem. 260: 8526-8531. (1985)

88. Salo, T; Lyons, J.G., Rahemtulla, F.; Birkedal-Hansen, H. & Larjava, H.
Transforming growth factor- ß-1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes.
J. Biol. Chem. 266: 11436-11441. (1991)

89. Sambrook, J. Maniatis, T. und Fritsch, E.F.
Molecular cloning – a laboratory manual.
In Cold Spring Harbor laboratory press. New York S. 737-1875 (1989)

90. Sato, H.; Takino, T.; Okada, Y.; Cao, J.; Shinagawa, A.; Yamamoto, E. und Seiki, M.
A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells.
Nature 370: 61-65. (1994)

91. Sato, H.; Kinoshita, T.; Takino, T.; Nakayama, K. und Seiki, M.
Activation of a recombinant membran type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and ist interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2.
FEBS Lett. 393: 101-104. (1996)

92. Sato, H.;Tanaka,M.; Takino, T.; Inoue, M.; und Seiki, M.
Assignment of the human genes for membran-type-1, -2, and –3 matrix metalloproteinases (MMP14, MMP15, MMP16) to 14q12.2, 16q12.2-q21, and 8 q21, respectively, by in situ hybridization.
Genomics 39: 412-413. (1997)

93. Schaarschmidt, P.
Modulation der Expression zellulärer Gene infolge einer Zytomgalievirus-Infektion
Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie, Universität Ulm(2000)

94. Senior, R.M.; Griffin, G.L.; Fliszar, C.J.; Shapiro, S.D.; Goldberg, G.I. und Welgus, H.G.
Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases.
J. Biol. Chem. 266: 7870-7878. (1991)

95. Sinzger, C.; Jahn, G.
Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis.
Intervirology 39: 302-319 (1996)

96. Sires, U.I.; Murphy, G.; Baragi, V.M.; Fliszar, C.J.; Welgus, H.G.; Senior, R.M.
Matrilysin is much more efficient than other matrix metalloproteinases in the proteolytic inactivation of alpha 1-antitrypsin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 204: 613-620. (1994)

97. Speir , E., Modali, R., Huang, E.S., Leon, M.B., Shawl, F., Fikel, T. und Epstein, S.E.
Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis.
Science 265: 391-394. (1994)

98. Spurr, N.K.; Gough, A.C.; Gosden, J.; Rout, D.; Proteous, D.J.; Heyningen, V.V. und Docherty, A.J.P.
Restriction fragment length polymorphism analysis and assignment of the metalloproteinases stromelysin and collagenase to the long arm of chromosome 11.
Genomics 2: 119-127. (1988)

99. Stamminger, T. und Fleckenstein, B.
Immediate-early transcription regulation of human cytomegalovirus
In Cytomegaloviruses,. J.K. McDougall (Hrsg.). Berlin. Springer-Verlag. S. 3-19. (1990)

100. Stenberg , R.M.; Fortney, J.; Barlow, S.W.; Magrane, B.P.; Nelson, J.A. und Ghazal, P.
Promotor-specific transactivation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains.
J. Virol. 64: 1556-1565. (1990)

101. Stetler-Stevenson, W.G.; Kruttzsch, H.C. und Liotta, L.A.
Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2): a new member of the metalloproteinase inhibitor family.
J. Biol. Chem. 264: 17374-17378. (1989)

102. Stetler-Stevenson, W.G.; Aznavoorian, S. und Liotta, L.A.
Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis.
Annu. Rev. Cell Biol. 9: 541-573. (1993)

103. Strongin, A.Y.; Collier, I.; Bannikov, G.; Marmer, B.L.; Grant, G.A. und Goldberg, G.I.
Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase.
J. Biol. Chem. 270: 5331-5338. (1995)

104. Taylor, H.P. und Cooper, N.R.
The human cytomegalovirus receptor in fibroblasts is a 30 kilodalton membrane protein
J. Virol. 64: 2484-2490. (1990)

105. Tryggvason, K.; Hoyhtya, M. und Salo, T.
Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion.
Biochim.Biophys. Acta 907: 191-217 (1987)

106. Ugwu, F.; Van Hoef, B.; Bini, A.; Collen, D.; Lijnen, H.R.
Proteolytic cleavage of urokinase-type plasminogen activator by stromelysin-1 (MMP-3).
Biochemistry 37: 7231-7236. (1998)

107. Uitto, V.J.; Schwartz, D. und Veis, A.
Degradation of basement-membrane collagen by neutral proteases from human leukocytes.
Eur. J. Biochem.105: 409-417. (1980)

108. Van Wart, H.E. und Birkedal-Hansen, H.
The cystein switch: A prinziple of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5578-5582. (1990)

109. **Vochem, M**.; **Hamprecht, K**.; **Jahn, G**.; **Speer, C.P**.
Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk
Pediatr. Infect. Dis. J. 17: 53-58. (1998)

110. Verrechia, F.; Rossert, J.; Mauviel, A.
Blocking sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo : implications for the treatment of tissue fibrosis.
J. Invest. Dermatol. 116: 755-763. (2001)

111. Vierling , J.M. und Fenell, R.H. Jr.
Histopathology of early and late human hepatic allograft rejection: evidence of progressive destruction of interlobular bile ducts.
Hepatology 5: 1076-1082. (1985)

112. Vu, T.H. und Werb, Z.
Matrix metalloproteinases: effector of development and normal physiology
Genes and Development 14: 2123-2133. (2000)

113. Wagner, E.K. und Bloom,D.C.
Experimental Investigation of Herpes Simplex Virus Latency
Clinical Microbiolgical Reviews: 419–443 (1997)

114. Wang, X; Huong, S.M.; Chiu M.L.; Chiu M.L.; Raab-Traub, N.; Huang, E.S.
Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus.
Nature 424: 456-461. (2003)

115. Wernicke, D.; Seyfert, C.; Hinzmann, B.; Gromnica-Ihle, E.
Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis.
J. Rheumatol. 23: 590-595. (1996)

116. Wing, B.A.; Johnson, R.A. und Huang, E.S.
Identification of postiive and negative regulatory regions involved in regulating expression of the human cytomegalovirus UL94 late promotor: role of IE2-86 and cellular p53 in mediating negative regulatory function.
J. Virol. 72: 1814-1825. (1998)

117. Woessner, J.F.
Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling
FASEB J. 5: 2145-2154. (1991)

118. Wright, H.T.J., Goodheart, C.R., und Lielausis A.
Human Cytomegalovirus. Morphology by negative staining
Virology 23: 419-424. (1964)

119. Yoruchko, A.D.; Kowalik, T.F.; Huong, S.M. und Huang, E.S.
Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF- kappa B p105/p50 and p65 promotors.
J. Virol. 69: 5391-5400. (1995)

120. Yoruchko, A.D.; Hwang, E.S.; Rasmussen, L.; Keay,S.;Pereira, L. und Huang, E.S.
The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappa B during infection.
J. Virol. 71: 5051-5059. (1997)

121. Yoruchko, A.D.; Mayo, M.W.; Poma, E.E.; Baldwin, A.S., Jr. und Huang E.S.
Induction of the transcripting factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promotors.
J. Virol. 71: 4638-4648. (1997)

122. Zhu , H.; Cong, J.P.; Mamtora, G.; Gingeras, T. und Shenk, T.
Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleptide arrays.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14470-14475. (1998)