

**Der Einfluss einer  
Cytomegalovirus Infektion auf  
das Risiko eines Leukämie-Rezidivs  
nach Knochenmarktransplantation**

**Dissertation**  
zur Erlangung des Grades  
**„Doktor der Naturwissenschaften“**

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes-Gutenberg-Universität

**Katja Christine Erlach**

geb. am 25.10.1972 in Rüsselsheim/Main

Mainz, im Mai 2003

Dekan:  
1. Berichtstatter:  
2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2003

Die Doktorarbeit wurde im Fachbereich Medizin am Institut für Virologie der Johannes  
Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Institut für Virologie  
Univ.-Prof. Dr. M. J. Reddehase  
Obere Zahlbacher Str. 67

55131 Mainz

Die Betreuung der Doktorarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-  
Universität wurde durch Herrn Univ.-Prof. Dr. G. Wegener übernommen.

Institut für Zoologie  
Univ.-Prof. Dr. G. Wegener  
Becherweg 9-11

55099 Mainz

Wissenschaft ist ein mächtiges Werkzeug.  
Wie es gebraucht wird,  
ob zum Heile oder zum Fluche des Menschen,  
hängt vom Menschen ab,  
nicht vom Werkzeug.  
Mit einem Messer kann man töten  
oder dem Leben dienen.  
Wir dürfen also die Rettung nicht  
von der Wissenschaft,  
sondern nur vom Menschen erwarten.

*Albert Einstein, Über den Frieden*

---

## Zusammenfassung

Eine Erkrankung durch das humane Cytomegalovirus (hCMV) und ein Rezidiv des Ausgangstumors sind zwei gravierende Komplikationen im Rahmen der Therapie von Malignomen des hämatopoetischen Systems durch Knochenmarktransplantation (KMT). Eine mögliche pathogenetische Interaktion zwischen hCMV-Infektion und einem von einer Minimalen Residualen Leukämie (MRL) ausgehenden Rezidiv wurde bislang in klinischen Verlaufsstudien nach KMT noch nicht systematisch untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CMV auf ein Lymphom in einem Modellsystem untersucht. Dazu erweiterten wir das etablierte Modell der murinen CMV (mCMV) Infektion nach experimenteller syngener KMT mit dem Mausstamm BALB/c als Spender und Empfänger durch ein B-Zell-Lymphom als weiteren Parameter. Als Modell-Lymphom diente uns eine mit dem Reportergen *lacZ* transfizierte, *ex tumore* klonierte, in der Leber hochgradig tumorigene Variante (Klon E12E) des von BALB/c abgeleiteten B-Zell-Lymphoms A20. Die Arbeiten führten zur Erstbeschreibung einer anti-metastatischen Wirkung der mCMV-Infektion (Erlach et al., 2002; J. Virol. 76: 2857-2870).

Im neu etablierten Tiermodell konnte erstmals gezeigt werden, dass eine CMV-Infektion die Ansiedelung eines murinen B-Zell-Lymphoms in der Leber deutlich verringert. Damit wurde die Entstehung einer letalen Tumorerkrankung, abhängig von der Ausgangslast an Tumorzellen signifikant verzögert oder sogar ganz verhindert.

Die Suche nach Mechanismen, die diesen antitumoralen Effekt von mCMV verursachen, führte zu folgenden Ergebnissen: Im Unterschied zu onkolytischen Viren basiert die antitumorale Wirkung von mCMV nicht auf einer zytozidalen Infektion der Lymphomzellen. Darüber hinaus zeigt mCMV keine zytostatische oder Apoptose-induzierende Wirkung. Außerdem sind die rekonstituierenden Knochenmarkzellen als Effektoren für den anti-Tumoreffekt auszuschließen. Direkte zytotoxische, sowie systemische Effekte von TNF-alpha konnten als antitumorale Mechanismen ausgeschlossen werden. Die intravenöse Applikation von UV-inaktiviertem Virus zeigte ebenfalls eine Inhibition des Lymphomwachstums, so dass der antitumorale Effekt offenbar durch virale Strukturproteine (Virion-Proteine) ausgelöst wird.

Auf der Basis dieser Daten vermuten wir eine Inhibition der Extravasation (transendotheliale Migration/Diapedese) der Tumorzellen aufgrund einer gestörten Kommunikation zwischen Tumorzelle und sinusoidalem Endothel der Leber. Das virale Hüll-Glykoprotein B kann aufgrund seiner signalinduzierenden Wirkung als ein guter Kandidat angesehen werden.

## Summary

Cytomegalovirus (CMV) infection and tumor relapse are major complications in the therapy of hematopoietic malignancies by bone marrow transplantation (BMT). So far there has been given little attention to a possible pathogenetic interplay between CMV and lymphomas. Specifically, tumor relapse emanating from a minimum residual leukaemia (MRL) has not yet been systematically examined in BMT patients with a primary or reactivated CMV infection. For studying a possible influence of infection on the risk of tumor relapse, the established model of murine cytomegalovirus (mCMV) infection and experimental syngeneic BMT in the BALB/c mouse was extended by the introduction of a liver-adapted, *ex tumore* isolated clonal variant E12E of the BALB/c-derived B-cell lymphoma A20.

Notably, mCMV infection was found to exert an antitumoral effect in that tumor growth in the liver was retarded and lethality significantly delayed. First attempts to elucidate the mechanism have ruled out a number of proposed possibilities. Specifically, the effect was not immune-mediated, not mediated by cytokines, such as TNF-alpha, and was not caused by cytopathogenic infection or by apoptosis of tumor cells (Erlach et al. 2002. J. Virol. 76: 2857-2870).

Further studies have shown that a difference in the rate of tumor cell immigration into liver tissue becomes apparent as early as 24 hours after intravenous infusion of the tumor cells, and that the antitumoral effect can be elicited by intravenous application of non-replicative virions, but not by preincubation of the tumor cells with virions.

It is proposed that CMV inhibits liver metastasis of lymphomas by the binding of envelope glycoproteins, with gB being a candidate, to endothelial cells. Perturbation of gene expression in endothelial cells is likely to interfere with tumor cell extravasation at some step in the complex process that involves rolling, adhesion, and transendothelial migration.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
Summary.....	VI
Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1 Einleitung .....	1
1.1 Cytomegaloviren in der Familie der Herpesviren.....	1
1.2 Struktur der Cytomegaloviren.....	1
1.3 Replikation der Cytomegaloviren.....	3
1.4 Übertragung und klinische Bedeutung des humanen CMV .....	4
1.5 Das Glykoprotein B von hCMV .....	6
1.6 Das murine Tumor/CMV-Modell .....	8
1.7 Die Knochenmarktransplantation und deren Problematik .....	9
1.8 Remission oder Progression des Tumors .....	11
1.9 Tumorwachstum und Metastasenbildung .....	13
1.9.1 Komponenten der metastatischen Kaskade .....	13
1.9.2 Migration und Extravasation von Zellen .....	15
1.10 Ziel der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden .....	17
2.1 Material .....	17
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte.....	17
2.1.2 Plastikwaren.....	18
2.1.3 Chemikalien für die Zellkultur .....	20
2.1.4 Chemikalien für die Histologie .....	21
2.1.5 Puffer und Kulturmedien für die Zellkultur .....	22
2.1.6 Puffer und Lösungen für die Histologie .....	24
2.1.7 Antikörper.....	26
2.1.8 Versuchstiere .....	27

---

2.1.9	Das murine CMV.....	27
2.1.10	Die B-Lymphom-Zelllinie A20 .....	27
2.2	Methoden .....	28
2.2.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur .....	28
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl .....	28
2.2.3	Die <i>LacZ</i> -Färbung .....	29
2.2.4	Antivirale Killerzellen.....	30
2.2.5	Generierung von A20/ <i>lacZ</i> -Klonen der ersten Generation .....	31
2.2.6	Gewinnung von Knochenmarkzellen .....	36
2.2.7	Gewinnung von Zellsuspensionen aus Organen .....	37
2.2.8	Anlage von MEF zur mCMV-Produktion .....	38
2.2.9	mCMV-Produktion und Virustiterbestimmung .....	39
2.2.10	Knochenmarktransplantation und Infektion.....	41
2.2.11	Vorbereitung der Organe für die histologischen Färbungen.....	41
2.2.12	Histologische Färbungen .....	44
2.2.13	Histomorphometrische Analyse der Tumorfoci .....	51
3	Ergebnisse .....	54
3.1	Abhängigkeit der A20-Tumorletalität im KMT-Modell von der initialen Tumorzellzahl und mCMV-Infektion .....	54
3.2	Einfluss der KMT auf die A20-Tumorletalität.....	57
3.3	Organtropismus der A20-Zellen .....	58
3.4	Klonierung des Leber-adaptierten A20-Subklons E12E .....	60
3.4.1	<i>In vivo</i> Untersuchung der A20/ <i>lacZ</i> -Klone der ersten Generation .....	61
3.4.2	Generierung der A20/ <i>lacZ</i> -Klone zweiter Generation .....	62
3.5	Der antitumorale Effekt von mCMV unter KM-Rekonstitution und Gabe antiviraler Killerzellen.....	66
3.6	Einfluss von mCMV auf das Wachstum der E12E-Zellen <i>in vitro</i> .....	70
3.7	Analyse von Apoptose und Proliferation der E12E-Zellen <i>in vivo</i> .....	71
3.8	Quantitative Analyse des <i>in vivo</i> Wachstums des E12E-Lymphoms .....	73
3.9	Untersuchung einer möglichen Antikorrelation zwischen Tumorwachstum und der Anzahl infizierter Hepatozyten .....	76

---

3.10	Das Wachstum der E12E-Lymphomzellen ist durch Tumor Nekrose Faktor- (TNF-) alpha nicht beeinflussbar .....	77
3.11	Langfristige Beobachtung von Tieren mit geringer initialer E12E-Tumorzelllast.....	79
3.12	Minimale effektive Wirkdosis von mCMV .....	80
3.13	Zeitpunkt der Infektion .....	81
3.14	Serum als Mediator des antitumoralen Effektes .....	83
3.15	Intraplantare Gabe von mCMV <sup>UV</sup> .....	86
3.16	Intravenöse Gabe von mCMV <sup>UV</sup> .....	87
4	Diskussion .....	89
5	Literatur .....	104
6	Anhang .....	116
	Danksagung.....	130

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines hCMV-Partikels nach M. Reschke <sup>©</sup> .....	2
Abbildung 2: Zwei verschiedene Modelle zur Ausschleusung von Herpesviren aus der infizierten Zelle. ....	3
Abbildung 3: Das murine CMV-Modell. ....	8
Abbildung 4: Mögliche Wirkung einer CMV-Infektion nach KMT.....	10
Abbildung 5: Phasen der Tumormetastasierung.....	14
Abbildung 6: Plasmid pcDNA3 der Firma Invitrogen <sup>©</sup> .....	32
Abbildung 7: Klonierungsstrategie für das Plasmid pcDNA3/ <i>lacZ</i> .....	33
Abbildung 8: Vermessen der Tumorkolonien mit Binokular und Mikroskop.....	53
Abbildung 9: Titration der Tumorzellen. ....	55
Abbildung 10: Einfluss von verschiedenen A20-Zellzahlen auf das Überleben in KM- transplantierten Tieren. ....	57
Abbildung 11: Pathogenität der A20 Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.....	58
Abbildung 12: Tumorbesiedelung verschiedener Organe.....	59
Abbildung 13: <i>lacZ</i> -exprimierende Zellen des Klons IID11 nach X-Gal-Färbung.....	61
Abbildung 14: Pathogenität der <i>lacZ</i> -Subklone <i>in vivo</i> . ....	62
Abbildung 15: Gesteigerte Tumorigenität nach der <i>in vivo</i> Passage.....	64
Abbildung 16: Tumorigenität der <i>ex tumore</i> reisolierten Sublinien des Klons IID11 im Vergleich mit der Parentalzelle A20.....	65
Abbildung 17: Sterbekurven von Tieren, die eine suboptimale Zahl an KMZ zur Rekonstitution erhielten.....	66
Abbildung 18: Sterbekurven von Tieren, die einen adoptiven Transfer erhielten.....	67
Abbildung 19: Sterbekurven von Tieren, die mit 10 <sup>7</sup> KMZ rekonstituiert wurden. ....	68
Abbildung 20: Sterbekurven von immunkompetenten Tieren.....	69
Abbildung 21: Zellwachstumskurven von E12E <i>in vitro</i> . ....	70
Abbildung 22: Immunhistologische Analyse einer möglichen Wechselbeziehung zwischen Lymphom und mCMV.....	71
Abbildung 23: Immunhistologische Analyse von Proliferation und Apoptose der Lymphomzellen. ....	72
Abbildung 24: Lebermakroskopien nach Tumorgabe und +/-Infektion. ....	73
Abbildung 25: Quantitative Analyse des E12E-Wachstums in der Leber.....	74

Abbildung 26: Wachstumskinetik von E12E in der Leber an repräsentativen Schnitten. .....	75
Abbildung 27: Korrelationsanalyse zwischen dem Grad der Infektion und dem Tumorwachstum in der Leber. ....	76
Abbildung 28: Zellwachstumskurven von E12E <i>in vitro</i> unter Zugabe von rmTNF- alpha. ....	77
Abbildung 29: Einfluss von TNF-alpha auf das E12E-Tumorwachstum <i>in vivo</i> . ....	78
Abbildung 30: Einfluss einer verringerten Tumorlast auf das Versterben der Tiere...	80
Abbildung 31: Einfluss der mCMV-Infektionsdosis auf das Tumorwachstum. ....	81
Abbildung 32: Einfluss des Zeitpunktes der mCMV-Infektion auf das Tumorwachstum. .....	82
Abbildung 33: Zellwachstumskurven von E12E <i>in vivo</i> unter Zugabe von murinem Serum. ....	84
Abbildung 34: Einfluss verschiedener Komponenten auf das Tumorwachstum. ....	85
Abbildung 35: Intraplantare Gabe von UV-inaktiviertem mCMV.....	86
Abbildung 36: Die intravenöse Gabe von UV-inaktiviertem mCMV führt zu einem antitumoralen Effekt.....	88
Abbildung 37: Schematische Darstellung des Glykoprotein B von hCMV.....	101
Abbildung 38: Klonierungsstrategie für das MHV-68-gB-BAC bzw. HSV-gB-BAC..	102
Abbildung 39: Generierung von RV-mCMV-gB-Pseudotypen. ....	103

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
A. dest.	Einfach destilliertes Wasser
AIDS	<i>Acquired Immuno-Deficiency Syndrome</i>
Ak	Antikörper
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
$\alpha$	alpha, ansonsten im Kontext mit Antikörper anti-
$\beta$	beta
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CMV	Cytomegalovirus
CTL	<i>Zytolytic T Lymphocyte</i> (zytolytischer T-Lymphozyt)
d	day(s), engl. Tag(e)
DAB	3'3-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
E	<i>Early</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
$\gamma$	gamma
Gal	Galaktosidase
GvH	Graft-versus-Host
GvHD	<i>Graft-versus-Host Disease</i> (GvH-Erkrankung)
Gy	<i>Gray</i>
h	hour(s), engl. Stunde(n)
hCMV	humanes Cytomegalovirus
HE	Hämatoxylin/Eosin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HvG	<i>Host-versus-Graft</i>
IE	<i>Immediate Early</i>
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunhistochemie/Immunhistologie
IL	Interleukin
i.pl.	intraplantar
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
KMZ	Knochenmarkzellen
L	<i>Late</i>
<i>lacZ</i> -Gen	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
mCMV	murines Cytomegalovirus

mCMV <sup>UV</sup>	UV-inaktiviertes mCMV
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MEF	Murine Embryofetale Fibroblasten
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
moi	<i>multiplicity of infection</i>
MRL	Minimale Residuale Leukämie
NS	Normalserum
p. a.	<i>pro analysi</i>
p. i.	<i>post infection</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
pfu	<i>plaque forming unit</i>
p.i.	<i>post infection</i>
p.t.	<i>post transplantation</i>
rh	rekombinant human
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SPF	<i>Specified Pathogen Free</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TCA	Trichloressigsäure
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>Units</i>
UV	Ultraviolettes Licht
VSP	Virus-Standard-Puffer
Wo	Woche(n)

Hinweis: International übliche Terminologie auf Englisch wurde beibehalten und zur Kennzeichnung *kursiv* gesetzt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Cytomegaloviren in der Familie der Herpesviren

Die **Cytomegaloviren** (CMV) gehören aufgrund ihrer strukturellen und biologischen Eigenschaften zur Familie der **Herpesviridae**. Bis heute konnten bei verschiedenen Wirbeltierarten fast 100 unterschiedliche Herpesviren identifiziert werden. Die verschiedenen Herpesviren rufen unterschiedliche Symptome bei der Infektion hervor. Das Wort „Herpes“ leitet sich von der „kriechenden“ Ausbreitung des Hautausschlags bei Herpes-Simplex-Virusinfektionen beim Menschen ab (griechisch *herpein*: kriechen).

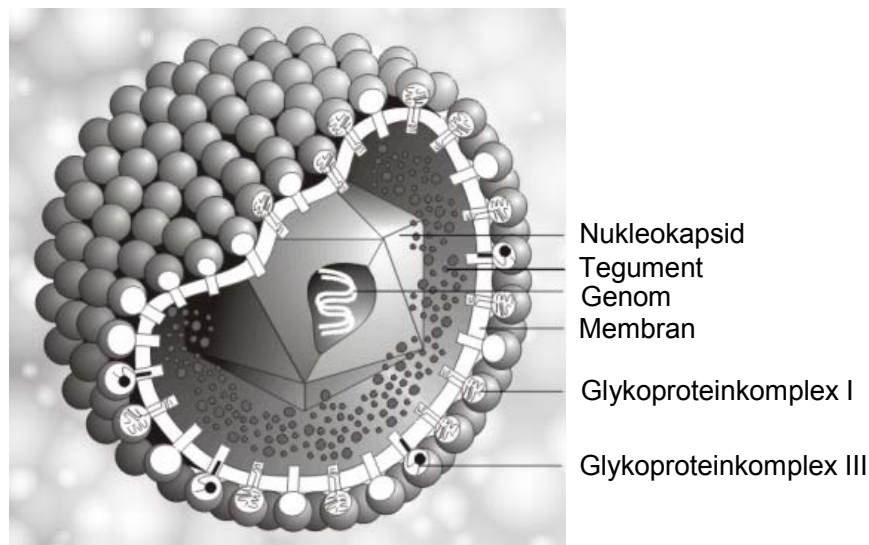
Eine besondere Eigenschaft der Herpesviren ist die Ausbildung von Latenz. Die Herpesviren haben die Fähigkeit lebenslang im Wirtsorganismus zu verbleiben, ohne chronische Krankheitsbilder auszulösen. Dabei persistiert das Virus in Zellen des Wirtes, ohne dass infektiöse Viruspartikel gebildet werden. Das Virus ist für das Immunsystem des Wirtes in dieser Phase nicht erkennbar. Erst wenn eine Reaktivierung stattfindet, wird wieder infektiöses Virus gebildet (Roizman et al., 1996).

Aufgrund der Pathogenität, des Zelltropismus und der Vermehrungseigenschaften unterscheidet man drei Unterfamilien (van Regenmortel et al., 2000): Die **Alphaherpesvirinae** haben ein breites Wirtsspektrum, besitzen einen kurzen Replikationszyklus und etablieren Latenz in den Neuronen sensorischer Ganglien. Wichtige Vertreter der Alphaherpesvirinae sind z. B. die bereits erwähnten Herpes-Simplex-Viren Typ 1 und 2 (HSV-1; HSV-2), sowie das Varicella-Zoster-Virus (VZV). **Betaherpesvirinae** sind streng speziesspezifisch. Dieser Unterfamilie wird die Gattung **Cytomegalovirus** (CMV) zugeordnet (Stinski et al., 1990; Roizman, 1996). Das CMV verdankt seine Namensgebung der Eigenschaft, dass mit CMV infizierte Zellen sich stark vergrößern (Zytomegalie) (Weller et al., 1960). Die Betaherpesvirinae besitzen die größten herpesviralen Genome und haben einen langsamen Vermehrungszyklus. **Gammaherpesvirinae**, wie beispielsweise das Epstein Barr Virus (EBV), besitzen ein eingeschränktes Wirtsspektrum und sind B-lymphotrop.

## 1.2 Struktur der Cytomegaloviren

Morphologisch sind die Cytomegaloviren den anderen Mitgliedern der Herpesfamilie sehr ähnlich. Der Durchmesser der verschiedenen herpesviralen Virionen beträgt

120 bis 200 nm. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das **Core** (Kern), das aus einem fibrillären Proteingerüst besteht und das lineare, doppelsträngige **DNA-Genom** enthält. Die DNA ist umgeben von einem ikosaedrischen Kapsid. Das **Kapsid** besteht aus 162 Kapsomeren (150 Hexameren und 12 Pentameren), denen außen eine Matrix aus Proteinen, das Tegument, angelagert ist. Das **Tegument** ist eine amorphe Proteinmatrix, die überwiegend aus Phosphoproteinen besteht. Die Virushülle (*envelope*) ist eine Lipidmembran, die sich von der inneren Kernmembran der Wirtszelle ableitet und viral kodierte Glykoproteine enthält (Abb. 1).



**Abbildung 1: Aufbau eines hCMV-Partikels nach M. Reschke<sup>®</sup>.**

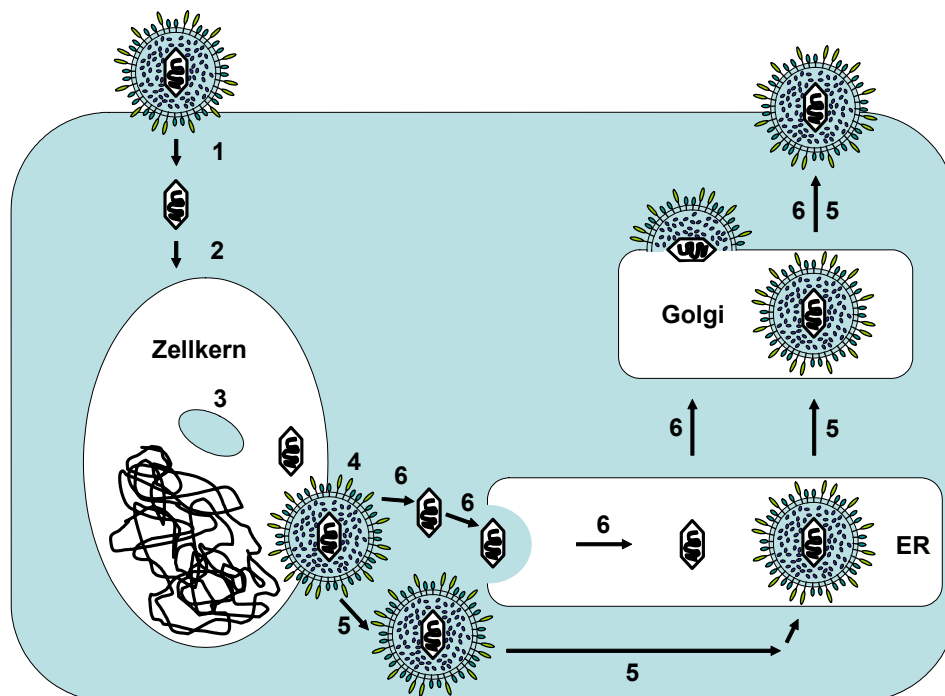
Im Inneren des Virions findet man ein Protein-Core, welches das lineare, doppelsträngige DNA-Genom enthält. Es ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, das aus mehreren Virusstrukturproteinen besteht. Zwischen dem Kapsid und der von der inneren Kernmembran abgeleiteten Hüllmembran befindet sich das Tegument, das verschiedene regulatorisch aktive Proteine enthält. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in die sowohl zelluläre als auch virale Glykoproteine eingelagert sind. Die viralen Glykoproteine des hCMV sind in definierten Komplexen auf der Virusoberfläche organisiert. Quelle: [www.virology.net/Big\\_Virology/EM/VirusWeb2.jpg](http://www.virology.net/Big_Virology/EM/VirusWeb2.jpg)

Bei der humanen CMV-Infektion entstehen neben den intakten Virionen auch nicht infektiöse Viruspartikel. Diese als *dense bodies* bezeichneten Strukturen besitzen keine virale DNA und kein Kapsid und bestehen hauptsächlich aus dem viralen Tegumentprotein pp65. Murines CMV zeigt im Gegensatz zu dem humanen CMV keine Bildung von *dense bodies*. Allerdings bildet es zusätzlich zu den Monokapsiden auch Virionen mit mehreren Nukleokapsiden (Multi-Kapsid-Virionen) (Chong & Mims, 1981).

### 1.3 Replikation der Cytomegaloviren

Wie bei allen Herpesviren ist der Replikationszyklus des murinen und humanen CMV streng reguliert und kaskadenartig organisiert.

Die Adsorption des Virions beginnt mit einer spezifischen Bindung von Virushüllproteinen an Rezeptormolekülen der Zelloberfläche und führt zur Verschmelzung der Virus- und Wirtszellmembran (Abb. 2). Im Fall der Cytomegaloviren ist bis heute nur der Rezeptor Heparan-Sulfat-Proteoglykan bekannt, wobei ein zweiter Rezeptor vermutet wird (Albrecht et al., 1976; LaFemina & Hayard, 1986; LaFemina & Hayard, 1983).



**Abbildung 2: Zwei verschiedene Modelle zur Ausschleusung von Herpesviren aus der infizierten Zelle.**

(1) Adsorption und Aufnahme des Virus an der Zelloberfläche. Das Virus verliert seine äußere Hülle und das Kapsid wird entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. (2) Das lineare Genom wird aus dem Kapsid freigesetzt und zirkularisiert. (3) Im Kern erfolgen die Genexpression und die Replikation. Während der L-Phase wird das lineare Genom wieder in Kapside verpackt (4), die dann aus dem Kern austreten und eine äußere Hülle erhalten. Bei der *single envelope* Theorie (5) hat das Virus bereits bei seinem Austritt seine endgültige Hülle erhalten, die lediglich im Golgi/ER noch modifiziert wird. Die *double envelope* Theorie besagt, dass (4) das Virus seine im Kern erhaltene Hülle wieder an der äußeren Kernmembran abstreift und nur die Kapside ins Zytosol (6) entlassen werden. Die endgültige Hülle erhält das Virus erst durch Knospung im Golgi-Apparat. Schließlich wird das fertige Virus freigesetzt (6).

Das Kapsid und das Tegument gelangen ins Zytoplasma. Das Kapsid wird an den Mikrotubuli zum Kern transportiert. Dabei gelangt das Virusgenom durch Kernporen ins Nukleoplasma, wo es zum Episom zirkularisiert wird und die kaskadenartig regulierte Genexpression beginnt. Nun setzt die erste von drei Transkriptionsphasen, die **immediate early (IE)-Phase** ein. In der Zelle kommt es zu Interaktionen von zellulären Transkriptionsfaktoren mit dem CMV-Genom und damit zur Transkription von IE-Genprodukten. Diese haben regulatorische Funktion für die koordinierte Expression von **early (E)- Phase**-Genen. Die DNA-Synthese findet nach dem *rolling circle*-Mechanismus statt und resultiert in der Bildung eines einzigen DNA-Doppelstrangs, der mehrere Einheiten des viralen Genoms enthält. Mit der DNA-Replikation beginnt die **late (L)-Phase**. In dieser letzten Phase werden vor allem Strukturproteine zur Bildung der Virionen und zum Zusammenbau der Viruspartikel exprimiert. Kapsid, DNA und Tegumentproteine assemblieren mit der inneren Kernmembran. Der Austrittsmechanismus des Kapsids aus dem Kern und der Erwerb der Hüllmembran werden noch kontrovers diskutiert.

Es existieren zwei Theorien: die *single envelope* und die *double envelope* Theorie. Bei der *single envelope* Theorie wird davon ausgegangen, dass die äußere Virushülle beim Austritt aus dem Kern erworben wird, also der äußeren Kernmembran entspricht, und während der Ausschleusung des Virus aus der Zelle nicht mehr abgegeben wird, sondern enthaltene Proteine bei der Wanderung durch den Golgi-Apparat modifiziert werden. Diese Beobachtung beruht auf Untersuchungen an dem HSV-1 (Enquist et al., 1998; Johnson et al., 1998; Roizman et al., 1996; van Genderen et al., 1994). Die *double envelope* Theorie besagt, dass das virale Kapsid beim Austritt aus dem Kern eine erste Hülle erhält, diese aber im Zytoplasma wieder abstreift und das Kapsid erst bei der Wanderung durch das Endoplasmatische Retikulum (ER) und den Golgi-Apparat seine endgültige Hülle erhält. Diese *double envelope* Theorie wurde für das Pseudorabies-Virus (Granzow et al., 1997) (PrV), das Varicella-Zoster-Virus (VZV) (Zhu, 1995; Gershon et al., 1994) und andere Herpesviren bestätigt (Skepper et al., 2001; Radsak et al., 1996; Whealy et al., 1991).

## 1.4 Übertragung und klinische Bedeutung des humanen CMV

Das humane Cytomegalovirus (hCMV; auch HHV-5 genannt) ist ein weit verbreitetes Virus. Die Verbreitung von hCMV ist abhängig vom Lebensalter, den Lebensbedingungen und dem -umfeld, welche die CMV Übertragung begünstigen

können. Die häufigste Übertragung erfolgt durch die Muttermilch auf das Kind. Bei Kleinkindern kann es beim Spielen zur Übertragung von hCMV durch Speichel- und Körperflüssigkeiten kommen. Auch die Benutzung von gemeinsamem Spielzeug kann zur hCMV-Infektion führen. Somit ist die Ansteckungsgefahr in Kindergärten und -krippen sehr hoch (Reddehase, 2002). Im Erwachsenenalter wird hCMV auch über sexuelle Kontakte weitergegeben. Neben diesen häufigen Übertragungswegen kann auch eine Infektion durch Organtransplantate oder Blutpräparate erfolgen. Innerhalb der Gruppe der seronegativen Transplantatempfänger werden immerhin 60-90% der Patienten durch Organe seropositiver Spender infiziert (Britt & Alford, 1996; Ho, 1995).

In Mitteleuropa und Nordamerika beträgt die Durchseuchungsrate 50-80%, in den Entwicklungsländern bereits im Kindesalter meist 100% (Emery & Griffith, 1990; Ho, 1995).

Ist ein Mensch mit hCMV infiziert, so breiten sich die Viren über den Blutstrom aus, wobei wahrscheinlich mononukleäre Phagozyten und zirkulierende Endothelzellen Träger des Virus sind (Stoddard et al., 1994). Das hCMV infiziert Zellen der Speicheldrüse, Niere, Nebenniere, Leber, Milz, Lunge und des Knochenmarks (Britt & Alford, 1996; Plachter et al., 1996). Den Zustand der Latenz etabliert hCMV in Endothelzellen und in Vorläuferzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (Fish et al., 1998; Hahn et al., 1998; Söderberg-Nauclér et al., 1997). Der genaue Mechanismus der zur Latenz führt ist bisher nicht bekannt (Prosch et al., 1999; Söderberg-Nauclér & Nelson, 1999).

Eine hCMV-Infektion in der Schwangerschaft kann zur diaplazentaren Übertragung des Virus führen. Dies kann zu Schädigungen des Fötus oder zum Abort führen. Bei kongenital infizierten Neugeborenen werden vor allem Schädigungen des zentralen Nervensystems, Hörschäden, Hepatosplenomegalie und Thrombozytopenie beobachtet (Boppa et al., 2001; Stagno et al., 1986).

Die Primärinfektion mit hCMV verläuft meist mit nur geringer Symptomatik (leichtes Fieber, Schmerzen in den Speicheldrüsen, Halsschmerzen). Bei 5-10% der Patienten ist der Krankheitsverlauf etwas schwerer. Diese zeigen ein Mononukleose-ähnliches Bild, sowie gelegentlich Lymphozytose, Splenomegalie oder eine milde Hepatitis, mit passagerem Anstieg der Transaminasen. Nach einer Primärinfektion mit hCMV wird das Virus im jeweiligen Wirt latent.

Bei immundefizienten oder immunsupprimierten Personen jedoch (z. B. Transplantatempfänger, Tumor- und AIDS-Patienten) kommt es zu schweren Verlaufsformen (Smith & Brennessel, 1994; Meyers, 1984). Die hCMV-Infektion gehört zu den häufigsten opportunistischen Infektionen bei HIV-Patienten. Da die meisten HIV-Infizierten bereits mit hCMV infiziert sind, handelt es sich vorwiegend

um Reaktivierungen im Rahmen der eingeschränkten T-Zell-Kontrolle. Bei einer CD4-Zellzahl  $< 100/\mu\text{l}$  liegt das Risiko für eine hCMV-Infektion über 20 % und verdoppelt sich, wenn die CD4-Zellen unter  $50/\mu\text{l}$  liegen. Die klinischen Manifestationen der hCMV-Infektion sind sehr unterschiedlich. Neben der Chorioretinitis treten vor allem entzündliche Läsionen im Gastrointestinaltrakt, Pneumonie, Enzephalitis, Polyradikulitis und kutane Läsionen auf. Bei stark erniedrigten CD4-Zellen kann eine massive Virusreplikation in verschiedenen Organen scheinbar asymptomatisch vorliegen, wobei nicht immer eine entsprechende Klinik auftritt (Jacobson & Bredt, 2002; Harari et al., 2002).

## 1.5 Das Glykoprotein B von hCMV

Die viralen Glykoproteine des hCMV sind in definierten Komplexen auf der Virusoberfläche organisiert. Der Glykoproteinkomplex I besteht aus Homodimeren des Glykoprotein B (gB), welche über intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Eickmann et al., 1998).

Die Namensgebung eines viralen Proteins basiert auf der fortlaufenden Nummerierung ihrer potentiellen Leseramen auf dem Prototyp des Genoms. So wird beispielsweise das gB auch als gpUL55 (bzw. ORF M55 bei mCMV) bezeichnet; gp weist es als Glykoprotein aus, UL bezeichnet die Lokalisation des Gens auf dem UL-Segment. Zudem wird die Nummer des Leserahmens auf diesem Segment angegeben. Bevor nun die Struktur, die Synthese und die Eigenschaften, des gB im Speziellen beschrieben werden, werden die Glykoproteinkomplexe II und III kurz vorgestellt.

Der Glykoproteinkomplex II besteht aus den Glykoproteinen M (gpUL100) und N (gpUL73), die ebenfalls kovalent miteinander verknüpft sind (Kari & Gehrz, 1993; Mach et al., 2000). Der Glykoproteinkomplex III besteht aus den Glykoproteinen H, L und O (gpUL75, gpUL115 und gpUL74) (Cranage et al., 1988; Huber & Compton, 1998; Huber & Compton, 1999; Kaye et al., 1992). Diesem Komplex wird eine besondere Bedeutung bei der Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Wirtszelle zugeschrieben (Milne et al., 1998).

Das Glykoprotein B stellt mit bis zu 50% des Gesamtproteingehaltes der Virushülle die häufigste Oberflächenkomponente des reifen Virions dar (Britt & Mach, 1996).

Das gB ist innerhalb der Herpesvirenfamilie ein hochkonserviertes Oberflächenprotein. Zwischen den gB-Proteinen von Herpesviren verschiedener Subfamilien beträgt die Aminosäuresequenzhomologie etwa 40% (Chou & Marousek, 1992), zwischen hCMV und mCMV sogar 45% (Rapp et al., 1992).

Die Expression des gB-Gens erfolgt in zwei Abschnitten: Früh nach der Infektion erscheint ein bicistronisches Transkript, während in der L-Phase ein monocistronisches Transkript gebildet wird (Kouzarides et al., 1987; Smuda et al., 1997).

Das gB gehört zu den Membranglykoproteinen Typ I. Der Carboxyterminus des Moleküls ist zytoplasmatisch lokalisiert. Der Aminoterminus befindet sich dagegen im Lumen des jeweiligen Zellkompartiments (Basgoz et al., 1992). Am Aminoterminus des hCMV-gB befindet sich ein 24 Aminosäure- (AS-) langes Signalpeptid. Außerdem hat es 16 Cysteinreste und 16 potentielle N-Glykolisierungsstellen (Eickmann et al., 1998).

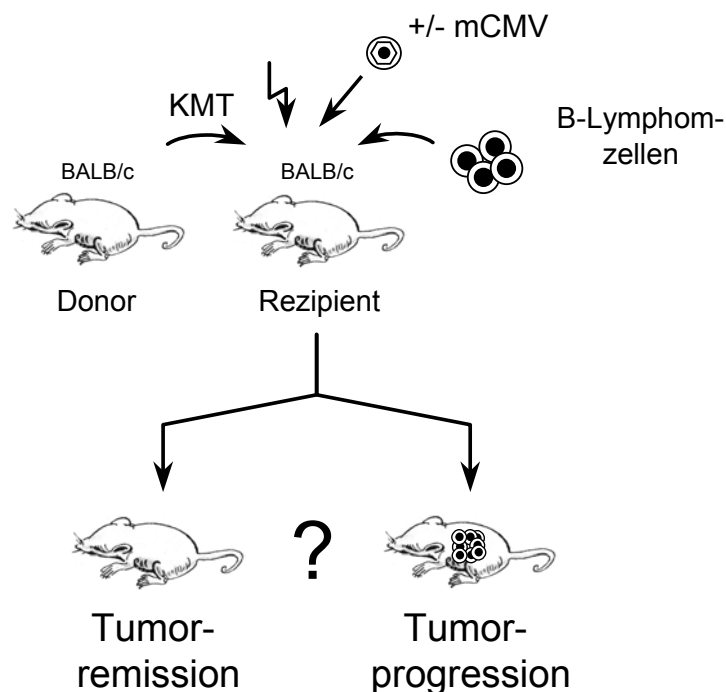
Die Synthese des gB-Moleküls erfolgt zunächst am rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) als Vorläuferprotein mit einer molekularen Masse von 102 kDa. Ein hydrophober Abschnitt des Moleküls (Reschke et al., 1995) dient der Verankerung in der Membran. Zunächst wird es kotranslational oligomerisiert und zu einer mannosereichen Form N-glykosiliert. Anschließend erfolgt die Passage durch den Golgi-Apparat. Im Golgi werden einige der endständigen Mannosereste entfernt und durch komplexe Zucker ersetzt, so dass die Molekularmasse auf 160 kDa ansteigt (Britt & Vugler, 1992; Gretch et al., 1988). Im Transgolgi-Netzwerk kommt es zur proteolytischen Prozessierung des Moleküls durch die zelluläre Endoprotease Furin (Vey et al., 1995), wodurch ein aminoterminaleres 90-110 kDa und ein carboxyterminales 52-58 kDa Prozessierungsprodukt entstehen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden bleiben (Britt & Vugler, 1992; Farrar & Greenaway, 1986). Letztlich wird das Molekül vom Transgolgi entlang des exozytotischen Weges an die Zelloberfläche transportiert (Radsak et al., 1996) und von dort in Vesikeln des tubulären Endosoms reinternalisiert.

Ein Teil des am ER synthetisierten gB folgt jedoch einem anderen Transportweg: das gB erfährt einen retrograden Transport in die innere Kernmembran (Radsak et al., 1996). Man stellt sich vor, dass das Molekül durch Diffusion in der Membranebene konstitutiv in die innere Kernmembran gelangt. Dabei wird es membrangebunden durch laterale Kanäle an den Kernporenkomplexen vorbei transportiert (Meyer & Radsak, 2000; Soullam & Worman, 1995; Smith & Blobel, 1993; Soullam & Worman, 1993). Eine folgende Interaktion mit einem Protein der inneren Kernmembran oder des Nukleoplasmas führen zu einer Retention des gB im Kernkompartiment. Die Lokalisation der viralen Glykoproteine im Kernkompartiment ist für den Prozess der Transportknospung durch die Kernmembranen ins Zytoplasma notwendig.

## 1.6 Das murine Tumor/CMV-Modell

Murines und humanes CMV zeigen viele Parallelen in Bezug auf ihre biologischen Eigenschaften und ihre genetische Organisation.

Im immunkompetenten Organismus kommt es nach einer Infektion zur Latenz und bei Immunsuppression zur Rekurrenz. Im immundefizienten Organismus werden, wie bereits erwähnt, insbesondere Organe wie Lunge, Leber, Milz, Speicheldrüse und die Nebennieren durch die Infektion geschädigt. Zudem führt CMV zu einer funktionellen Schädigung des Knochenmarkstromas und inhibiert dadurch die hämatopoetische Rekonstitution nach Knochenmarkstransplantation (KMT) (Steffens et al., 1998).



**Abbildung 3: Das murine CMV-Modell.**

Aufgrund der hohen Übereinstimmungen des Krankheitsbildes zwischen humaner und muriner CMV-Infektion ist ein Maus-Modell zur Erforschung von CMV geeignet. Dieses Modell dient in erster Linie zur Untersuchung von Fragestellungen, die beim Menschen nicht zu beantworten sind.

Im bereits etablierten mCMV-Modell nach KMT wird das hämatopoetische System der Rezipienten durch  $\gamma$ -Ganzkörperbestrahlung zerstört, die Tiere bekommen KM von syngenem Spendertieren und werden dann optional mit mCMV infiziert

(Reddehase et al., 1985). Dieses Modell wurde nun durch einen weiteren Parameter, nämlich die intravenöse Applikation von Tumorzellen erweitert (Abb. 3). Bei den Tumorzellen handelt es sich um die B-Lymphom-Zelllinie „A20“, die ursprünglich einer BALB/c-Maus entstammt (siehe Kapitel 2.1.10). Die Tumorzelllinie wurde gewählt, um der klinischen Situation bei Leukämie-Patienten möglichst nahe zu kommen.

Das Modellsystem diene nun dazu, zu untersuchen, ob die Virusinfektion das Wachstum der Tumorzellen beeinflusst.

## **1.7 Die Knochenmarktransplantation und deren Problematik**

Die Knochenmarktransplantation (KMT) wird bei Patienten mit Leukämien und einigen anderen bösartigen Erkrankungen angewandt. Die Übertragung von Knochenmark (KM) nach Ganzkörperbestrahlung ist für viele Leukämiepatienten die einzige Chance, geheilt zu werden.

Voraussetzung für eine KMT ist das Erreichen einer Remission des Tumors durch eine vorhergegangene zytostatische Therapie. Nach einer Vorbehandlung mit Strahlen- und Chemotherapie (Konditionierung) gehen die Tumorzellen, aber auch als Nebenwirkung die gesunde Blutbildung, zugrunde.

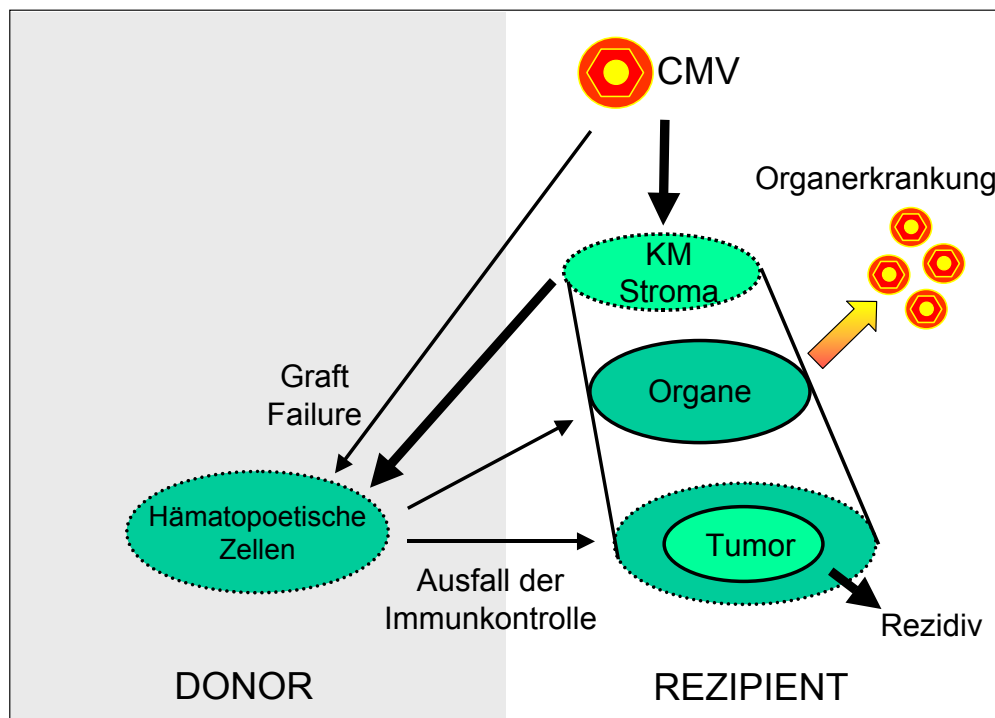
Bei der sich anschließenden Transplantation werden Stammzellen übertragen. Aus Stammzellen können sich alle Zellen des Blutes neu bilden. Diese Stammzellen können aus Knochenmark und auch aus peripherem Blut nach entsprechender Vorbehandlung des Patienten gewonnen werden. Im Idealfall entstehen dabei vollständige Knochenmarkchimären und der Patient ist geheilt. Ein zentrales Problem besteht aber darin, dass eine geringe Anzahl an Leukämiezellen gegenüber der hämatoablativen Behandlung resistent sein kann. Dadurch entsteht dann im Empfänger eine „Minimale residuale Leukämie“ (MRL), verbunden mit dem Risiko eines Leukämierezidivs, insbesondere in der Phase der Immundefizienz (Reddehase et al., 1985). Diese Phase dauert von der hämatoablativen Bestrahlung bis zur vollständigen Rekonstitution des Patienten, wenn das blutbildende System und das Immunsystem wieder voll funktionstüchtig ist.

Bei der autologen KMT wird dem Patienten eigenes KM bzw. eigene Blutstammzellen zurückübertragen. Dazu wird das zuvor entnommene Zellmaterial durch positive Selektion der Stammzellen (CD34<sup>+</sup>-Zellen) von möglicherweise enthaltenen Tumorzellen „gereinigt“. Eine autologe KMT behebt zwar die

Immundefizienz besonders effizient, generiert aber auch nur eine schwache *Graft versus Leukemia (GvL)* Immunantwort (Reddehase et al., 1986a; Reddehase et al., 1986b) gegen den syngenen Tumor, der im Rezipienten keine ausreichende antitumorale Abwehr induzieren konnte. T-Zell-vermittelte GvL-Reaktion gegen den syngenen Tumor kann nur generiert werden, wenn im sich rekonstituierenden Immunsystem keine Toleranz etabliert wird.

Bei der allogenen KMT erhält der Rezipient KM oder Blutstammzellen von einem Spender mit möglichst übereinstimmenden Gewebeantigenen. Am ehesten ist ein solcher Spender unter den Geschwistern des Empfängers zu finden. Die Wahrscheinlichkeit liegt hier bei etwa 30%.

Dem KMT-Empfänger werden die Stammzellen intravenös injiziert. Nach 3 bis 6 Wochen beginnt die Produktion neuer Blutzellen.



**Abbildung 4: Mögliche Wirkung einer CMV-Infektion nach KMT.**

Bei der KMT können weitere wesentliche Komplikationen auftreten: (1) Akute und chronische *Graft versus Host (GvH)* Erkrankung, (2) Transplantatverlust (*Graft Failure*) durch *Host versus Graft (HvG)* Reaktivität oder durch funktionelle Defizienz des Knochenmarkstromas im Transplantatempfänger und (3) opportunistische Infektionen im Stadium der temporären Immundefizienz (Abb. 4).

zu (1): Die mit dem Transplantat übertragenen Immunzellen können die Zellen im Körper des Empfängers als fremd erkennen und angreifen. Diese Reaktion führt zur „*Graft-versus-Host-Disease* (GvHD)“ (Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung) und betrifft insbesondere Haut, Leber und Darm. Die GvHD tritt häufig nach allogener KMT auf.

Um eine GvHD zu verhindern, werden Medikamente eingesetzt, welche die Funktion des Immunsystems einschränken oder hemmen. Diese Behandlung führt dazu, dass nach allogener KMT beim Patienten das erhöhte Infektionsrisiko für eine längere Zeit bestehen bleibt.

zu (2): In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass CMV stromale Zellen im Knochenmark infiziert und durch eine negative Regulation der Expression essentieller Hämatopoetine das *Engraftment* von Spender-Knochenmark inhibiert. Über einen solchen Mechanismus eines viral induzierten, partiellen *Graft Failure* sollten *GvH* und *Graft versus Leukemia* (*GvL*) Funktionen des Transplantats geschwächt werden. Bei der *GvL* können Zellen des Transplantats nicht nur gegen körpereigene, gesunde Zellen vorgehen, sondern sich auch gegen im Körper verbliebene Leukämiezellen richten. Dieser positive Effekt trägt dazu bei, dass möglicherweise noch verbliebene Leukämiezellen im Körper zerstört werden.

Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass eine starke antivirale Immunantwort zur Tumorremission beitragen könnte.

zu (3): Unter den infektionsbedingten Komplikationen nimmt die CMV-Erkrankung trotz Verfügbarkeit einer antiviralen Chemotherapie immer noch eine bedeutende Stellung ein. Die verschiedenen Komplikationen sind nicht voneinander unabhängig, sondern es bestehen pathogenetische Wechselwirkungen, deren Natur allerdings nur unzureichend beschrieben und verstanden ist. Über eine mögliche Wechselwirkung zwischen CMV-Infektion und Leukämie-Rezidiv gibt es kaum gesicherte Erkenntnisse.

Zur Beantwortung dieser offenen Fragen wollten wir deshalb das von uns bereits in Vorarbeiten etablierte Modell der murinen CMV-Infektion nach experimenteller KMT um den Parameter einer definierten residualen Tumorlast erweitern.

## 1.8 Remission oder Progression des Tumors

Zu einer Interferenz zwischen CMV und einer MRL nach KMT gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse in der Literatur. Es ist somit offen, ob

1. CMV ein Tumorrezidiv fördert,
2. CMV die Tumorremission begünstigt.

Ebenso bestand die Möglichkeit, dass keine Wechselbeziehung besteht.

Aus Vorarbeiten im murinen Modellsystem einer mCMV-Infektion und nach experimenteller KMT gab es für beide Alternativen gute Argumente.

Für die Förderung eines Tumorrezidivs spricht, dass mCMV, im Kontext der temporären Immundefizienz nach KMT, Zellen des KM-Stromas infiziert und die Expression wichtiger Hämatopoetine (IL-6, SCF, GM-CSF) negativ reguliert (Mayer et al., 1997). Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass mCMV die Ansiedelung von KMZ inhibiert und es somit zu einer Aplasie des KM kommen kann (Steffens et al., 1998). Ein von einer MRL ausgehendes Tumorrezidiv sollte durch eine gestörte Rekonstitution begünstigt werden, da die Immundefizienz zu einem Ausfall einer antitumoralen Immunantwort führt. Auch die Induktion anti-apoptotischer oder pro-mitotischer Zytokine könnten Signale zur Entwicklung eines Rezidivs sein.

Demgegenüber ist bekannt, dass CMV eine Vielzahl von Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Myozyten, Hepatozyten, Enterozyten, Pneumozyten und diverse Drüsenepithelzellen (Plachter et al., 1996), aber auch Makrophagen und Dendritische Zellen (Andrews et al., 2001; Hanson et al., 1999; Sinzger et al., 1996) infiziert. Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass eine onkolytische Infektion der Tumorzellen durch CMV eine Tumorremission begünstigt. Ebenso kann die Induktion anti-proliferativer oder pro-apoptotischer Zytokine nach CMV-Infektion zum Rückgang des Tumors führen (Räth et al., 1991; Terlikowski & Nowak, 2000; Terlikowski et al., 2001). Von TNF-alpha weiß man, dass es zytotoxisch auf Tumoren wirkt (Leibovich et al., 1987; Robertson et al., 1989) und aufgrund seiner systemischen Wirkung auf Endothelien die Extravasation von Tumorzellen verhindert (Fräter-Schröder et al., 1987).

Eine weitere Möglichkeit zur Förderung einer Tumorremission besteht darin, dass CMV die Genexpression der Tumorzelle beeinflusst. Man weiß bereits, dass das Binden des Virus-Hüllglykoproteins gB an seine zellulären Rezeptoren, während des *Attachment*- und *Entry*-Prozesses vielfältige Signaltransduktionsprozesse auslöst. Es kommt zur Auf- und Abregulation zellulärer, insbesondere IFN-responsiver Gene (Simmen et al., 2001; Zhu et al., 1998). Schließlich kann eine antivirale Immunantwort über „Bystander-Aktivierung“ einen antitumoralen Effekt im Immunsystem des infizierten Tieres hervorrufen.

## 1.9 Tumorwachstum und Metastasenbildung

Kennzeichen maligner Tumoren sind ein teilweiser oder völliger Verlust der Differenzierung der Zelle und das unkontrollierte, schnelle Wachstum. Für das erfolgreiche Wachstum einer Tumorkolonie ist deshalb die Neubildung von Kapillaren entscheidend. So darf die Distanz zwischen einer Zelle und einem Kapillargefäß maximal etwa 150 µm betragen, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu garantieren.

Alle Zellen benötigen für den Stoffwechsel Sauerstoff und Nährstoffe, die über das Blutgefäßsystem transportiert werden. Bei einer abnehmenden Sauerstoffkonzentration beobachtet man eine Reduzierung der Zellproliferation (Bedford & Mitchell, 1974; Bouck et al., 1996).

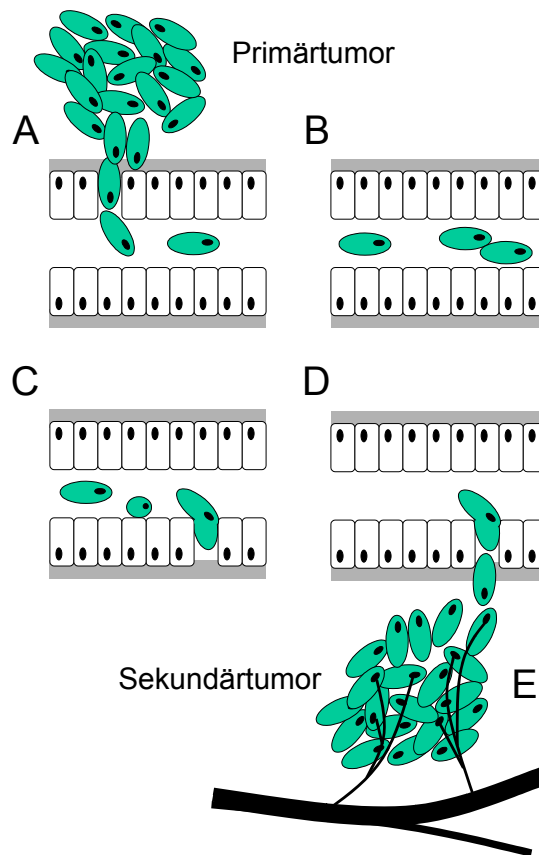
Des Weiteren besitzen Tumorzellen die Fähigkeit Gewebsgrenzen zu überwinden und in das umgebende Gewebe einzudringen. Verantwortlich ist, neben der veränderten Expression von Adhäsionsmolekülen, die Fähigkeit, umliegende Strukturen aufzulösen um eine erfolgreiche Invasion und Metastasierung zu gewährleisten.

### 1.9.1 Komponenten der metastatischen Kaskade

Für die Bildung von Metastasen ist eine Abfolge von Schritten erforderlich, die als metastatische Kaskade bezeichnet wird (Thomas, 1994):

- (A) Ablösen von Zellen des Primärtumors, Durchwanderung des Interstitiums und der Basalmembran;
- (B) Verschleppung der Tumorzellen mit dem Blut- oder Lymphstrom bzw. der Flüssigkeit seröser Körperhöhlen;
- (C) Adhäsion der Tumorzellen an Endothelien der Gefäßwand bzw. an der Serosa;
- (D) Extravasation und Infiltration des umgebenden Gewebes;
- (E) Zellproliferation, Migration und Anschluss an das örtliche Gefäßsystem.

In der folgenden Abbildung sind die Phasen der Tumormetastasierung gezeigt.



**Abbildung 5: Phasen der Tumormetastasierung.**

Bei der Erhaltung der strukturellen Integrität der einzelnen Gewebe spielt die Extrazellulärmatrix (EZM) eine zentrale Rolle. Die Matrix beeinflusst die grundlegenden zellulären Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Adhäsion (Alberts et al., 1997). Für die Matrixerhaltung ist ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der Matrixkomponenten erforderlich (Matrisian, 1992). Durch die veränderte Zusammensetzung der EZM-Komponenten, der Kollagenasen der Zelle und der Expression spezifischer Adhäsionsrezeptoren kommt es zu einer generellen Desorganisation des Zytoskeletts. Die EZM bildet Basalmembranen von 50 bis 100 nm Dicke, die von den wandernden Tumorzellen überwunden werden müssen (Mignatti & Rifkin, 1993). Die EZM besteht aus mehreren Komponenten:

- Kollagen (Hauptbestandteil der EZM, insbesondere Typ IV, aber auch bis zu 50% des Gesamtproteins der Zelle);
- Laminin (zweithäufigste Komponente der Basalmembran, vermittelt Zelladhäsion);
- Fibronectin;

- Entactin und Nidogen, Glykosaminoglykane und Elastische Fasern (Bryant-Greenwood, 1998; Vogelmann et al., 1999).

### 1.9.2 Migration und Extravasation von Zellen

Zur Migration von Zellen kommt es bei vielen physiologischen Prozessen wie z. B. bei der Entwicklung der Plazenta, dem Austritt von inflammatorischen Zellen aus dem Gefäßsystem oder bei der Organentwicklung.

Das infiltrative Wachstum eines malignen Tumors beruht auf der Migration einzelner Tumorzellen in das umgebende Stroma. Die Interaktion von Zellen mit der EZM läuft in vier Schritten ab (Eichbichler, 2001; Allavena et al., 1991):

- a. Anheftung;
- b. Triggerung (Aktivierung der Oberflächenrezeptoren);
- c. starke Adhäsion (vermittelt durch aktivierte Integrine);
- d. Migration / Invasion (durch lokale promigratorische Faktoren, darunter Zytokine und Chemokine).

Die Modulation des metastatischen Potentials der Tumorzellen ist Wachstumsfaktoren unterworfen (Eichbichler, 2001; Teale et al., 1988). Zu den wichtigsten Regulatoren gehören u. a.:

- proteolytische Enzyme, z. B. Metalloproteinasen (MMP) (Liotta et al., 1979, 1980 und 1991; Nakajima et al., 1991) und die dazugehörigen Inhibitoren TIMP (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*)
- die EZM und ihre zellulären Rezeptoren (Selektine, Immunglobuline, Integrine (Ruoslahti, 1991));
- Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone sowie ihre Rezeptoren (Allavena et al., 1991), darunter Prostaglandine, aber auch humanes Choriongonadotropin (Allavena et al., 1991).

## 1.10 Ziel der Arbeit

Die medizinische Bedeutung der hCMV-Infektion bei Knochenmarktransplantation (KMT) führte zum Aufbau eines kliniknahen Tiermodells: der experimentellen KMT

mit konkurrierender mCMV-Infektion. In einer Reihe von Projekten wurde anhand dieses Modells die Pathogenese und Immunkontrolle der mCMV-Infektion als Paradigma für die hCMV-Infektion im spezifischen Kontext einer KMT untersucht (Reddehase et al., 1985; Holtappels et al., 1998; Podlech et al., 1998; Steffens et al., 1998a; Steffens et al., 1998b; Podlech et al., 2000). Die hCMV-Infektion ist aber bei weitem nicht die einzige und auch nicht die gravierendste Komplikation bei der KMT. Ein von residualen Tumorzellen (*Minimal Residual Leukemia*, MRL) ausgehendes Rezidiv des Ausgangstumors ist ein weiteres zentrales Problem nach KMT. Über einen möglichen Zusammenhang zwischen einer hCMV-Infektion und einem Rezidiv-Risiko war zu Beginn dieser Dissertation nicht viel bekannt.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war, um diese Frage experimentell bearbeiten zu können, in das bereits etablierte mCMV-KMT-Modell den Parameter einer Leukämie/eines Lymphoms einzubringen, um eine mögliche Interferenz zwischen CMV und Tumor zu studieren. So war es möglich zu untersuchen, ob eine Wechselwirkung besteht, und ob die CMV-Infektion ein Tumorrezidiv oder eher die Tumorremission fördert.

Dazu sollte in das ausgewählte B-Zell-Lymphom A20 das Reporter-gen  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*-Gen) eingebracht werden und durch *limiting dilution*-Klonierung ein hoch tumorigener Subklon für weitere Arbeiten im Mausmodell ausgewählt werden.

Je nachdem, ob nun die CMV-Infektion ein Rezidiv oder die Remission des Tumors begünstigen würde, sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit Ansätze aufgezeigt werden, die einen Beitrag zur Aufklärung eines möglichen Mechanismus leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Brutschrank B15	(Heraeus, Hanau)
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	(Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	FACSort (Becton Dickinson, Heidelberg)
Feuchte Kammern	Haushaltswarenbedarf Gerda (Schuch, Langgöns)
Heizplatte/Magnetrührer	IKA Combimag RET (Janke & Kunkel, Staufen)
Invertmikroskop	Leitz DM IL (Leitz, Wetzlar)
Kryostat	Leica CM3050 (Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch)
Mikrotom	Mikrotom HM 355 (Microm, Walldorf)
Mikrowelle	Sharp, LM 16
Multikanalpipetten	Micronic (IBS integra Biosciences, Fernwald)
Paraffinerhitzer	HistoTAPplus (Leica, Bensheim)
Pipetten	(Eppendorf, Hamburg) (Gilson, Villies Le Bel (F))
Präparative Zentrifuge	Sorvall, RC-5C plus
Schüttler	Hypo-Shaker (neo-Lab, Heidelberg)
Stickstofftank	Air Liquide Arpege 140
Sterile Werkbank	Heraeus Lamin Air HB 2472 und HV 2472 (Heraeus, Hanau)
Tischzentrifugen	Mikrozentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)

---

	Megafuge 2.0 (Heraeus, Hanau)
	Labofuge 200 (Heraeus, Hanau) centrifuge 5417 (Eppendorf, Hamburg)
Ultrazentrifuge	Sorvall, COMBI plus
Vollschutz-Kleintier- Bestrahlungsanlage	Typ OB 58-BA (Buchler, Braunschweig)
Waagen	BP 61 (Sartorius, Göttingen) Kern 510 (Albstadt)
Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach)
Zählmikroskop	Nikon SE (Nikon, Düsseldorf)

### 2.1.2 Plastikwaren

Einfrierröhrchen	1,8ml CryoTube Vials (Nalge Nunc International, Denmark; Nr. 375418)
Einmal-Plastikpipetten	10ml (Greiner, Nürtingen; Nr. 607180)  25ml (Greiner, Nürtingen; Nr. 760180)
Einmal-Pipettenspitzen	für 1ml-Pipette für 200µl- und 100µl Pipetten für 10µl-Pipette
Einmalspritzen	1ml (Braun, Melsungen; Nr. 916 140/6)  2ml (Braun, Melsungen; Nr. 0460 6027)
Einmalspritzen	10ml (Braun, Melsungen; Nr. 0460 6108)  50ml (Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 308500)
Reaktionsgefäße	1,5ml (Eppendorf, Hamburg; Nr. 0030 102.002)  2,0ml (Eppendorf, Hamburg; Nr. 0030 120.086)
Einblock-Kassetten	Tissue Tek III (Sakura Finetek BV, Zoeterwoude, NL)

---

Kanülen	0,40x20mm (Braun, Melsungen)
Küvetten	Gene Pulser Küvetten, 4mm (Biorad, München; Nr.1652088) 0,45x12mm (Braun, Melsungen)
24-Lochplatten	für adhärenente Zellen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 35 3047) für Suspensionszellen (Greiner, Nürtingen; Nr. 662102)
48-Lochplatten	für adhärenente Zellen (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 35 3078)
Mikrotiterplatten	96 <i>Well</i> -Flachbodenplatten (Greiner, Nürtingen; Nr. 655180) 96 <i>Well</i> -Rundbodenplatten (Greiner, Nürtingen; Nr. 650180)
Zellkulturflaschen	25cm <sup>2</sup> (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 35 3014) 75cm <sup>2</sup> (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 35 3135)
Zellkulturschalen	60/15mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 3004) 100/20mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 3003) 150/25mm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 3025)
Zentrifugenröhrchen	50ml Spitzboden (Falcon, Heidelberg; Nr. 2070) 14ml Spitzboden (Falcon, Heidelberg; Nr. 2096) 5ml Rundboden (Greiner, Nürtingen; Nr. 115261)
Zell-Nylonsieb	100µm (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg; Nr. 352360)

### 2.1.3 Chemikalien für die Zellkultur

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, in p. a. Qualität bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde ausschließlich Wasser aus der Apotheke der Universität Mainz (Aqua ad iniectabilia, Braun Melsungen) eingesetzt.

Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
G418 Sulfate	Calbiochem, La Jolla (CA)
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
HEPES	Gibco, Eggenstein
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumferricyanid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumferrocyanid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methylcellulose	Fluka, Buchs SG, Schweiz
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Na-EDTA	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sucrose (Sacharose)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Biochrom, Berlin
TÜRK's Lösung	Merck, Darmstadt
Trypsin	Difco, Michigan (USA)
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

### 2.1.4 Chemikalien für die Histologie

Aceton	Riedel de Haën, Seelze
Ammonium-Nickelsulfat-Hexahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), Buchs (Schweiz) (#09885)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg (#A7906)
DAB (3,3' Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eosin Y Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formalin (37%ig)	Merck, Darmstadt
Hämalaun nach Mayer	Chroma-Gesellschaft, Köngen (#2E010)
Isopropanol	Apotheke der Universität Mainz
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kernechtrot-Aluminiumsulfat	Chroma-Gesellschaft, Köngen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Methanol	J. T. Baker, Holland
Natrium-Azid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Na-EDTA	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Neufuchsin-Kit	DAKO, Glostrup (Dänemark) (#K968/K596)
Paraffin, 56°C	Vogel-Histo-Comp, Giessen
Paraclear <sup>®</sup>	Quartett GmbH, Berlin (Earth Safe Industries Inc., NY)
Paramount <sup>®</sup>	Quartett GmbH, Berlin (Earth Safe Industries Inc., NY)
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Difco, Michigan (USA)

Xylol  
Merck, Darmstadt  
(#1.08685.2500)

### 2.1.5 Puffer und Kulturmedien für die Zellkultur

Die Zellkultur-Medien wurden von der Firma Gibco-BRL, Eggenstein bezogen und wurden wie folgt supplementiert (Endkonzentrationen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet):

#### **MEM (Minimum Essential Medium)**

(Nr. 21090-022)

L-Glutamin	[2mM]
Penicillin	[100U/ml]
Streptomycin	[0,1mg/ml]
FCS	[10% (v/v)]

#### **MEM 10x (Minimum Essential Medium)**

(Nr. 21435-029)

Zehnfach konzentriertes MEM

#### **RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute)**

(Nr. 31870-025)

L-Glutamin	[2mM]
Penicillin	[100U/ml]
Streptomycin	[0,1mg/ml]
2-Mercaptoethanol	[ $5 \times 10^{-5}$ M]
HEPES	[10mM]
FCS	[5% (v/v)]
+/-G418 Sulfat	[1mg/ml]

#### **PBS-Puffer Dulbecco (Phosphate Buffered Saline)**

8,0g	NaCl	[136mM]
0,2g	KCl	[26mM]
1,3g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	[8mM]
0,2g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	[1,5mM]
	H <sub>2</sub> O	ad 1l
		pH 7,4

Der PBS-Puffer wurde von der Apotheke des Klinikums der Universität Mainz bezogen (DPBS, Biowhittaker Europe, Vervies, Belgien).

**RBLB (Red Blood Lysing Buffer)** wurde von Sigma (Katalog-Nr. R-7757) bezogen. Dieser Puffer wurde zur Entfernung von Erythrozyten aus Organzellsuspensionen benutzt.

### Methylcellulosemedium

8,8g Methylcellulose

wurden in 360ml Aqua bidest. suspendiert, autoklaviert und über Nacht bei 4°C gerührt. Dann wurden folgende Substanzen zugegeben:

40ml	MEM 10x	[1x]
	L-Glutamin	[2mM]
	Penicillin	[100U/ml]
	Streptomycin	[0,1mg/ml]
	FCS	[5% (v/v)]

Methylcellulosemedium vor Gebrauch mit NaHCO<sub>3</sub> (Stock 55g/l) auf pH 7,5 einstellen.

### VSP (Virus-Standard-Puffer) mit 15%iger Sucrose

6,06g	Tris	[50mM]
3,73g	KCl	[1,2mM]
1,86g	EDTA	[5mM]
	A. dest.	ad 50 ml
		pH 7,8 einstellen
7,5g	Sucrose	[15% (w/v)]

Den Virus-Standard-Puffer steril filtrieren.

### X-Gal-Färbelösung

Für ein X-Gal-Aliquot

25mg 5-Br-4-Cl-3-Indoyl-β-D- galactopyranosid (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>BrClNO<sub>6</sub>)

in 625µl DMF ansetzen und einfrieren (-20°C).

Für die Gebrauchslösung werden

1	X-Gal-Aliquot (-20°C)	
125µl	1molare Kaliumferricyanid- lösung (C <sub>6</sub> FeK <sub>3</sub> N <sub>6</sub> )	[41,2 mM]

	250µl	0,5molare Kaliumferrocyanid- lösung ( $C_6FeK_4N_6 \times 3H_2O$ )	[52,8mM]
	50µl	1molare $MgCl_2$ -Lösung	[4,8 mM]
in	25ml	PBS gelöst	

## 2.1.6 Puffer und Lösungen für die Histologie

### AP-Puffer

7,9g	Tris-HCl	[100mM]
2,9g	NaCl	[100mM]
5,1g	$MgCl_2$	[ 50mM]
		ad 500ml
		pH 9,5 einstellen

### TBS-Puffer 10x (Tris buffered saline) Stammlösung

121g	Tris-HCl	[1 M]
8,8g	NaCl	[1,5M]
	Aqua dest.	ad 1l
		pH 7,4 einstellen

### TBS-Puffer 1x (Tris buffered saline) Gebrauchslösung

1:10 Verdünnung des 10x TBS-Puffers

### BSA-TBS 10% (w/v) Stammlösung

10g (w/v)	BSA	[10%]
	TBS(1x)	ad 100ml

Lagerung bei  $-20^\circ C$ .

### BSA-TBS (1%ige) Gebrauchslösung

mit TBS 1:10 verdünnen (Lagerung bei  $-20^\circ C$ )

### Citrat-Puffer

2,94g	Tri-Na-Citrat-Dehydrat	[10mM]
	Aqua dest.	ad 1l
		pH 6 einstellen

**20% (w/v) EDTA-Lösung** (zur Entkalkung)

200g	Na-EDTA	[506 mM]
800ml	Aqua dest.	

unter ständigem Rühren erhitzen und mit 40%iger (w/v) NaOH einstellen (ca. 50ml) bis der pH 7,4 ist, dann

Aqua dest.	ad 1l
------------	-------

**gepuffertes Formalin**

9,07g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	[66 mM]
11,86g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	[84 mM]
	Aqua dest.	ad 860ml
140ml	Formalin (Stamm- lösung 37%)	
		pH 7,4 einstellen

**5%ige TCA-Lösung** (zur Entkalkung)

50g	Trichloressigsäure	[5%]
40ml	Formalin (4%)	[0,16%]
	A. dest.	ad 1l

**Trypsin-Lösung**

8g	NaCl	[136 mM]
0,2g	KCl	[26 mM]
0,2g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	[1,5mM]
1,15g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	[8,1mM]
1,25g	EDTA	[3,4mM]
	Aqua dest.	ad 1l

anschließend Autoklavieren, nach dem Abkühlen 1,25g/l Trypsin zugeben und pH 7,4 einstellen.

**Eosin-Färbelösung**

5g	Eosin Y	[7,2mM]
70% (v/v)	Ethanol	ad 1l

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1 In der Histologie verwendete Antikörper, Kits und Seren

Spezifität-Fluorochrom	Isotyp	Klon	Quelle
Normalserum Kaninchen	Ig	polyklonal	Life Technologies, Nr. 16120099
Normalserum Ziege	Ig	polyklonal	Life Technologies, Nr. 16210064
Anti-CD45R/B220	Ratte IgG <sub>2a</sub> (kappa)	RA3-6B2	BDP Pharmingen, Nr. 553084 (alte Nr.01121 D)
Ziege Anti-Ratte-Biotin	Ig	polyklonal	BDP Pharmingen, Nr. 554014 (alte Nr.12112 D)
Kaninchen Anti- Maus/Mensch Aktive Caspase 3	IgG	polyklonal	R&D Systems, Nr. AF 835
Ziege Anti-Kaninchen IgG- Biotin	IgG	polyklonal	Sigma, Nr. B 8895
Maus Anti-PCNA	IgG <sub>2a</sub> , κ	PC10	BDP Pharmingen, Nr. 555 566
Ziege anti-Maus IgG (Fab)- Biotin	Ig	polyklonal	Sigma Nr. B 0529
Biotin/Avidin-Blocker (Biotin Blocking System)	-	-	DAKO, Nr. X 0590
Maus anti-mCMV-IE1 (pp89)	IgG1	Croma 101	Prof. Jonjic, Rijeka, Kroatien
Ziege anti-Maus-IgG	Ig	polyklonal	Sigma, Nr. M 5899
APAAP-Maus-Komplex (Alkalische Phosphatase anti- Alkalische Phosphatase)	Maus-IgG1	AP1B9	Sigma, Nr. A 7827
ABC-POD-Kit (PK-4000)	-	-	Vectastain PK-4000 von Vector Laboratories Inc.
ABC-AP-Kit (AK-5000)	-	-	Vectastain AK-5000 von Vector Laboratories Inc.
Neufuchsinsubstrat-Kit	-	-	DAKO, Nr. K 0596

### 2.1.8 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden im Tierstall der Klinisch-theoretischen Institute der Universität Mainz unter SPF (*Specified-Pathogen-Free*) Bedingungen gezüchtet. Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche Mäuse des murinen Inzuchtstammes BALB/cJ verwendet.

Der **BALB/cJ-Stamm** mit dem Haplotyp H-2<sup>d</sup> (K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup>, L<sup>d</sup>) kodiert in MHC-Klasse I-Loci für die Moleküle K<sup>d</sup>, D<sup>d</sup> und L<sup>d</sup>.

Die Tierversuche wurden unter der Nummer 177-07/001-3 genehmigt (Bezirksregierung Rheinhessen-Pfalz).

### 2.1.9 Das murine CMV

Die Infektion von Zellkulturen und Versuchstieren erfolgte mit dem Laborstamm des murinen Cytomegalovirus (mCMV, Smith strain, ATCC VR-1399; alte Nr. VR-194), mouse salivary gland virus) (Smith, M. G. 1954). Rawlinson sequenzierte das gesamte mCMV Genom dieses Virusstammes (Rawlinson et al., 1996).

Die Vermehrung des Virus erfolgte auf murinen embryonalen Fibroblasten (siehe Kap. 2.2.9).

### 2.1.10 Die B-Lymphom-Zelllinie A20

Die murine B-Lymphom-Zelllinie wurde von der *American Type Culture Collection* (ATCC, TIB 208) bezogen und entstammt ursprünglich einer weiblichen BALB/c Maus. Der Haplotyp ist H-2<sup>d</sup>, der Karyotyp ist diploid. Eine Chromosomenzählung aus Metaphase-Präparaten ergab eine durchschnittliche Chromosomenanzahl von 37 (Bereich: 33-38).

Charakteristische Oberflächenmarker sind das Immunglobulin G (IgG), MHC I und II, CD45R (B220), CD86 und CD95 (Fas).

Kulturmedium: RPMI mit 7,5% FCS

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Um Zellen langfristig zu lagern, werden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu muss ein besonderes Einfriermedium verwendet werden.

Dieses setzt sich zusammen aus:

95% FCS (v/v)  
5% DMSO (v/v)

DMSO verhindert durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen, die die Zellen beim Einfrieren schädigen können.

Zum Einfrieren wurden die als Pellet vorliegenden Zellen mit kaltem Einfriermedium auf eine Zellzahl von  $1-5 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt. Aliquots von 1ml wurden in sterile Einfrierröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in Styropor-Boxen bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren und am nächsten Tag zur Lagerung in die Dampfphase von flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen im  $37^\circ\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut, sofort in 50ml Kulturmedium verdünnt und anschließend durch Zentrifugieren pelletiert, erneut in Kulturmedium aufgenommen und schließlich in Zellkulturplatten ausgesät.

Um Kontaminationen durch Pilze und Bakterien zu verhindern wurden die Zellkulturarbeiten an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Verwendete Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert.

Die Zellen wurden in  $\text{CO}_2$ -Inkubatoren bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Gehalt in gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert. Dadurch wurden die auf physiologische Werte eingestellten pH-Werte der  $\text{CO}_2$ /Bicarbonat-gepufferten Medien aufrechterhalten.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Farbstoffe Trypanblau und TÜRK's-Lösung verwendet.

Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff und dient zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Tote Zellen nehmen Trypanblau sofort auf, das Zytoplasma färbt sich blau. Da die Zellmembran lebender Zellen erst nach 5-10min permeabel wird, dringt der Farbstoff entsprechend später ein.

Die TÜRK's-Lösung färbt alle Zellkerne blau und ermöglicht so eine Unterscheidung zwischen kernhaltigen Zellen (z. B. Leukozyten) und kernlosen Zellen (Erythrozyten).

Für die Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem definierten Verhältnis mit dem Farbstoff gemischt. Um einen Fehler bei der Berechnung der Zellzahl möglichst gering zu halten, wurde die Verdünnung der Zellsuspension so ausgewählt, dass mindestens 60 Zellen/Grossquadrat gezählt wurden. In einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1mm) wurden alle Zellen, die sich im Grossquadrat (geteilt in 25 Kleinquadrate) befanden, ausgezählt. Für jede Zählung wurden jeweils Zellen, die sich in zwei Großquadraten befanden, ausgezählt. Mit der folgenden Formel lässt sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension bestimmen:

$$N/n \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

N	=	Zahl der gezählten Zellen (in allen Großquadraten)
n	=	Zahl der ausgezählten Großquadrate
V	=	Verdünnungsfaktor
$10^4$	=	Kammerfaktor

### 2.2.3 Die LacZ-Färbung

Dieses Protokoll war ursprünglich nur für adhärent wachsende Zellen optimiert. Da es sich bei den A20//lacZ-Zellen jedoch um Suspensionszellen handelt, wurden die Zellen vor jeder einzelnen Behandlung abzentrifugiert. Dazu wurden spezielle Zentrifugeneinsätze für Zellkulturplatten verwendet (Heareus, Megafuge 2.0, 550xg, 8min).

- Erstes Waschen der Zellen:

8,76g	NaCl	[150mM]
1,53g	Natriumphosphat	[15mM]

in 100ml PBS lösen, dann pH 7,3 einstellen

- Fixieren der Zellen:

5,41ml	Formaldehyd (37%ig)	[2% (v/v)]
0,8ml	Glutaraldehyd (25%ig)	[0,2% (v/v)]

ad 100ml PBS

- Zweites Waschen der Zellen:

mit PBS

- Färbelösung auf die Zellen geben (Zusammensetzung siehe Kap. 2.1.5)

Die Zellen wurden mit der Färbelösung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 12-24 Stunden konnten die Zellen auf ihre β-Gal-Expression (blau gefärbte Zellen) untersucht werden. Die Zahl der blauen Zellen wurde dabei geschätzt oder in der Neubauer-Zählkammer genau bestimmt.

#### 2.2.4 Antivirale Killerzellen

Die Gewinnung der polyklonalen zytolytischen T-Lymphozytenlinie erfolgte aus Milzzellen von latent mCMV-infizierten BALB/c Mäusen. Durch *in vitro* Propagieren in IL-2-haltigem Medium und 2-wöchentliche Restimulation mit dem mCMV-IE-1-Peptid YPHFMPTNL differenzieren sich die *Memory*-CTL zu reifen, zytolytisch aktiven CTL, die im Tierversuch eingesetzt wurden (Reddehase et al., 1989).

Kulturmedium: MEM ALPHA MEDIUM mit 10% FCS und rh IL-2 (100U/ml)

## 2.2.5 Generierung von A20/*lacZ*-Klonen der ersten Generation

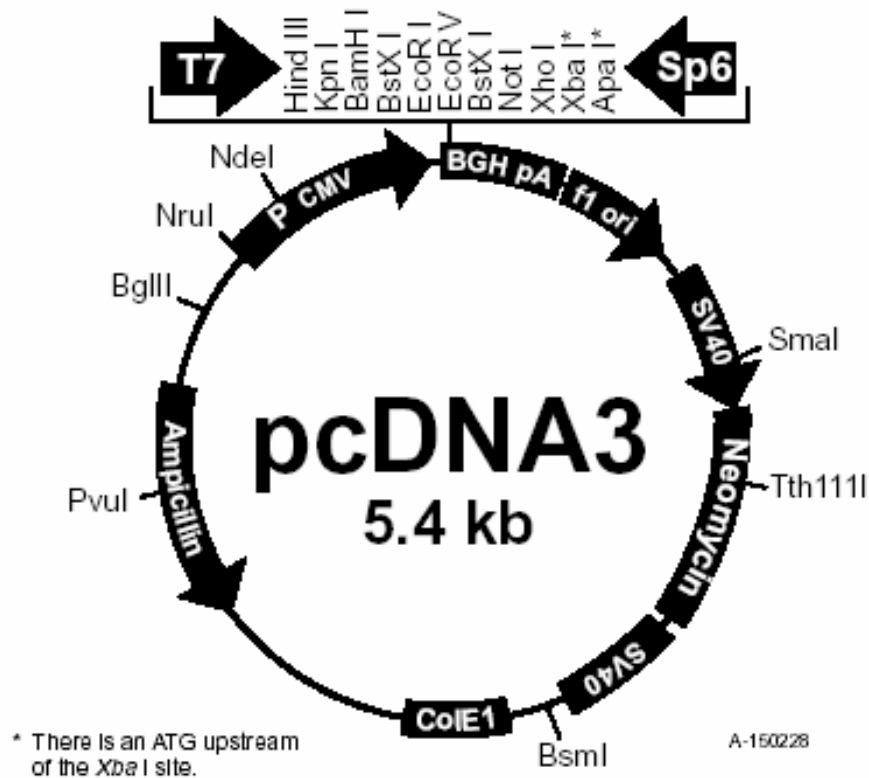
Die von uns ausgewählte A20-Tumorzelllinie entstammt ursprünglich einer weiblichen BALB/c-Maus. Somit besitzt die Zelllinie kein Y-Chromosom, anhand dessen sie in einer weiblichen Empfängermaus hätte nachgewiesen werden können. Um aber eine Elimination des Tumors oder auch eine minimale Residuale Leukämie (MRL) nachweisen zu können haben wir in die A20-Zellen einen Marker, nämlich das *lacZ*-Gen ( $\beta$ -Galaktosidase) eingeführt.

Nach Klonierung wurde der Vektor pcDNA3/*lacZ* durch Elektroporation in die A20-Zellen transfiziert. Um eine stabile Transfektion zu erreichen wurde, dafür der Vektor mit dem *lacZ*-Gen zuvor linearisiert. Anschließend wurde eine *limiting dilution* durchgeführt, mit welcher 113 Klone generiert werden konnten, die zwar alle das *lacZ*-Gen enthielten (Nachweis mittels *lacZ*-spezifischer PCR), jedoch eine stark unterschiedliche Expression des Reportergens *in vitro* zeigten (X-Gal-Färbung, siehe 2.2.3).

### 2.2.5.1 Herstellung des Vektors pcDNA3

Für die Herstellung dieses Vektors wurde das Plasmid pcDNA3 (#V790-20, Invitrogen, Leek, Holland) verwendet. Zuerst wurde durch einen Restriktionsverdau mit *Nru* I an Position 209 und mit *Xho* I an Position 972 der mCMV major IE *promoter/enhancer* entfernt (siehe Abb. 6).

Das *lacZ*-Gen wurde aus dem Plasmid *lacZ/gpt* (zur Verfügung gestellt von Martin Messerle, München) mittels Restriktionsenzym-Verdau mit *Hind* III geschnitten. Um die Ligation von DNA-Fragmenten mit nicht kompatiblen Enden zu ermöglichen, wurden mit der Klenow-Polymerase glatte Enden erzeugt. Das Klenow-Fragment besitzt eine 5'-3'-Polymeraseaktivität und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Hierdurch wurde die Ligation von DNA-Fragmenten ermöglicht, die durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen inkompatible Ende erhalten hatten.



**Abbildung 6: Plasmid pcDNA3 der Firma Invitrogen<sup>®</sup>.**

Der CMV-Promotor/Enhancer wurde durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen *Nru* I (209) und mit *Xho* I (972) entfernt. An diese Stelle wurde anschließend ein Fragment, welches aus dem RSV-Promotor und dem *lacZ*-Gen besteht, eingesetzt.

Anschließend wurde mit *Xho* I geschnitten. Das resultierende 4,5kb große Fragment enthielt das *lacZ*-Gen, den RSV-Promotor und einen polyA-Schwanz. Dieses wurde dann in den pcDNA3-Vektor ligiert.

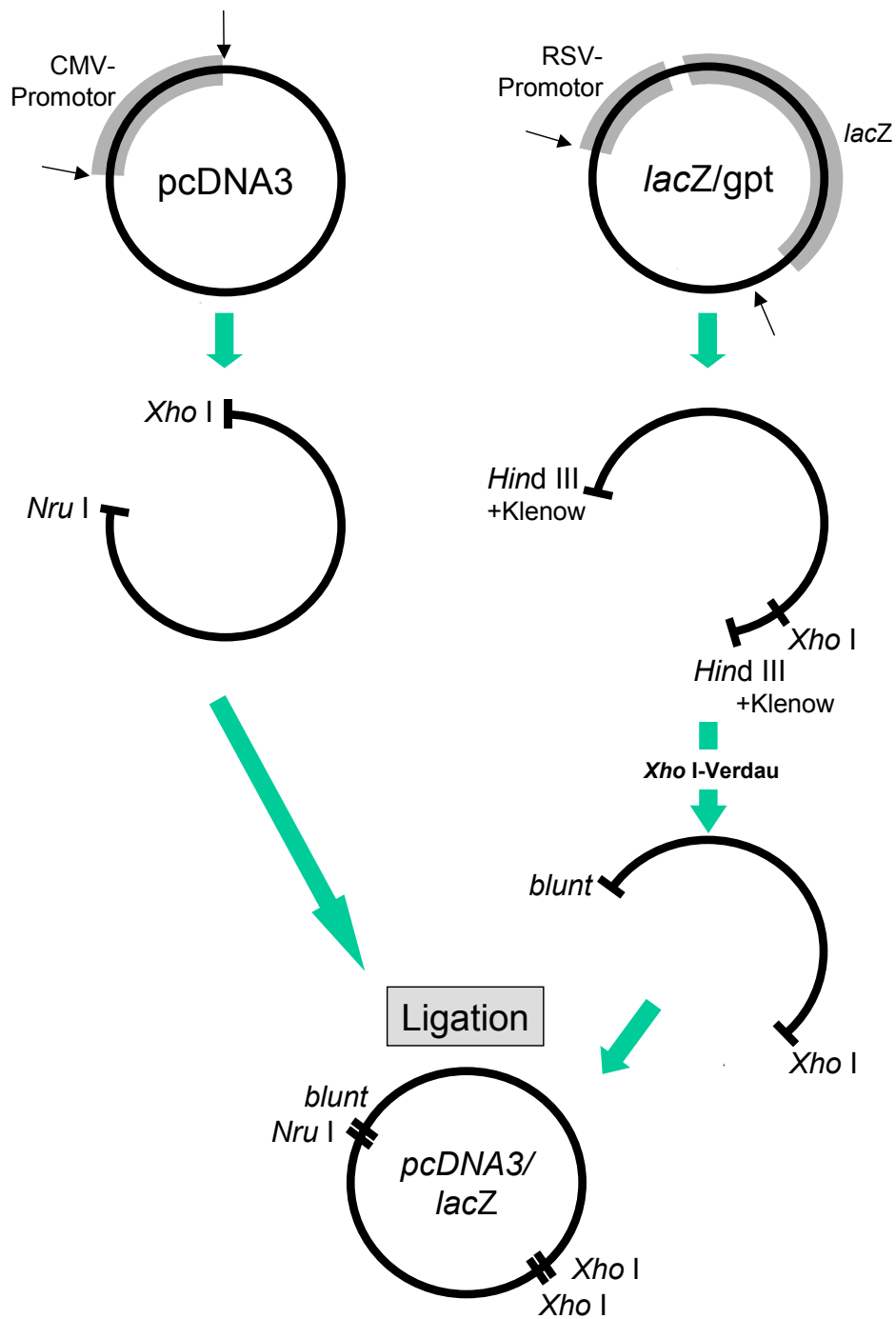


Abbildung 7: Klonierungsstrategie für das Plasmid pcDNA3/lacZ.

#### 2.2.5.2 Transfektion

Durch Elektroporation wurde in A20-Zellen der 13. Passage der Vektor pcDNA3/lacZ eingebracht. Dies wurde folgendermaßen durchgeführt:

Am Tag vor der Transfektion wurden  $5 \times 10^6$  A20-Zellen in 10ml-Petrischalen ausplattiert. Am Tag der Transfektion wurden diese in 50ml Röhrchen gesammelt, bei 150xg für 10min zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 500 $\mu$ l RPMI 1640 (ohne Supplemente) aufgenommen und 20 $\mu$ g mit Xba I linearisiertes pcDNA3//lacZ zugegeben.

Die Elektroporation wurde bei 400V und 960 $\mu$ F im Elektroporator durchgeführt (Gene pulser system model 2, Bio-Rad, München). Anschließend wurden die transfizierten Zellen in 2ml-Wells kultiviert.

Ab dem zweiten Tag nach Elektroporation wurden die Zellen allmählich (1:2 Splitt) unter G418-Selektionsdruck gesetzt.

### 2.2.5.3 Klonierung der A20//lacZ-Varianten

Die A20//lacZ-Zellen wurden in der 24. Passage einer „*limiting dilution*“ unterzogen. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von 1,5 Zellen/ml in Mikrotiterplatten (96-Lochplatten) ausgesät. Dies entspricht 0,3 Zellen/Well ( $\lambda$ , lamda = 0,3). In den insgesamt 960 Wells wuchsen schließlich in 113 Wells Zellklone heran.

Anhand eines Beispiels soll nun erklärt werden, wie die Nomenklatur der Klone entstanden ist: Auf der Platte I sind insgesamt 13 Klone gewachsen, ein Klon ist z. B. in der Spalte 4 und in der Reihe C gewachsen, somit hat dieser Klon die Bezeichnung I4C bekommen (Platte I, 4. Spalte, Reihe C).

Im Anhang I (Kap. 6) befindet sich eine schematische Darstellung der Ergebnisse dieser *Limiting Dilution*-Klonierung für jeden einzelnen Klon. Auf den zehn 96-Lochplatten sind die Wells, in welchen Klone gewachsen sind, grau markiert. Im Anhang II (Kap. 6) befinden sich die Ergebnisse zur  $\beta$ -Gal-Expression von jedem Einzelklon.

Basierend auf der Poisson-Verteilung lag die clone probability (Klonierungswahrscheinlichkeit) bei 0,86 ( $F(1)/F(0) = 0,86$ ):

$$F(0) = e^{-\lambda} \quad \text{und} \quad F(1) = \lambda \times F(0)$$

Nun ist es möglich, zu berechnen, wie oft es theoretisch vorkommt, dass ein gewachsener Klon ursprünglich nicht aus einer Zelle „hochgewachsen“ ist, sondern z. B. aus 2 oder mehr Zellen entstanden ist.

$$F(1) = e^{-\lambda} \quad \text{und} \quad F(2) = \lambda \times F(1), \text{ usw.}$$

Die aus den 113 Wells angezüchteten Kulturen wurden schließlich, aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit, dass es sich um biklonale (oder triklonale) Ereignisse handelt, der Einfachheit halber alle als Einzelklone bezeichnet.

#### 2.2.5.4 X-Gal-Färbung der Klone

Für einen Teil der generierten *lacZ*-Klone wurde im Abstand von je 2 Wochen eine X-Gal-Färbung durchgeführt. Die erste Färbung erfolgte beim ersten Split der „neu“ herangewachsenen Klone. Die zweite *LacZ*-Färbung erfolgte nach 4 und die dritte nach 6 Wochen. Dabei wurde der Anteil der Zellen eines Klons ausgezählt, die blau gefärbt waren. Eine Übersicht der X-Gal-Färbungen gibt die folgende Tabelle.

**Tab. 1: *lacZ*-Expression der verschiedenen A20/*lacZ*-Klone zu diversen Zeitpunkten nach *limiting dilution*.** Es wurden 88 Klone untersucht.

X-Gal-Färbung	Anzahl der Klone		
	nach 2 Wochen	nach 4 Wochen	nach 6 Wochen
negative Klone	13	14	4
Klone mit < 50 % positiven Zellen	60	21	42
Klone mit > 50 % positiven Zellen	15	43	22
100% positive Klone	0	10	20

Im Anhang II (Kap. 6) sind alle Ergebnisse der *lacZ*-Färbung für jeden einzelnen Klon in einer Tabelle gezeigt.

Zusammenfassung der Ergebnisse für die drei *lacZ*-Färbungen:

1. Mit zunehmender Zeit nach *limiting dilution* nahm die Anzahl der 100% *lacZ*-exprimierenden Klone zu.
2. Nach 6 Wochen *limiting dilution* war die Anzahl der negativen Klone geringer als nach der 2. Woche.
3. Es existierten keine Klone, die anfangs negativ waren und dann mehr als 50% *lacZ* exprimierten (siehe Kapitel Anhang, Kapitel II).
4. Drei Klone blieben stabil negativ.
5. Es zeigten sehr wenige Klone eine abnehmende Anzahl an *lacZ*-exprimierenden Zellen.

**Tab. 2: Prozentuale Verteilung der *lacZ*-Expression der verschiedenen A20/*lacZ*-Klone nach 6 Wochen.**

stabile <i>lacZ</i> -Expression	zunehmende <i>lacZ</i> -Expression	abnehmende <i>lacZ</i> -Expression	unterschiedliche <i>lacZ</i> -Expression
16,9 %	49,2 %	3,1 %	30,8 %

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Anteil der  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Zellen eines Klones im untersuchten Zeitraum stabil war oder zunahm.

## 2.2.6 Gewinnung von Knochenmarkzellen

Knochenmarkzellen (KMZ) wurden für Transplantationen benötigt.

Material:

- 5ml Spritze mit 0,40x20mm Kanüle
- RPMI + 5%FCS
- RPMI (ohne Zusätze)
- 50ml Röhrchen (zum Auffangen der KMZ)
- Zell-Nylonsieb

Durchführung:

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation oder CO<sub>2</sub>-Begasung getötet und kurz in 70%igen Alkohol zur Desinfektion getaucht. Die Hinterbeine wurden beidseitig entfernt, indem der Femurknochen von der Hüftgelenkpfanne abgetrennt wurde. Dann wurden Femur und Tibia freipräpariert. Nach dem Abschneiden der Epiphysen wurden die Markhöhlen der Knochen mit Hilfe einer feinen Kanüle mit RPMI (+ 5%FCS) durchspült und das KM aufgefangen. Die gesammelten KMZ wurden zweimal mit RPMI (ohne Zusätze) gewaschen (Zentrifugation: 8min bei 1800rpm, 681xg) und anschließend über das Zell-Nylonsieb filtriert. Nach der Zellzählung wurden die KMZ für die spätere Transplantation auf eine definierte Zellzahl in Medium ohne Zusätze eingestellt. Die erwartete Zellzahl liegt bei  $2\text{-}4 \times 10^7$  KMZ/Maus (2x Femur + 2x Tibia).

## 2.2.7 Gewinnung von Zellsuspensionen aus Organen

Material/Organ:

- Metallsieb
- 6cm Petrischale
- Pinzetten
- Zell-Nylonsieb
- RPMI + 5%FCS

### 2.2.7.1 Leber

Durchführung:

Die entnommenen Lebern wurden in 8ml RPMI überführt. Dann wurden die Organe auf dem Petrischalendeckel von fremdem Gewebe und von Blutresten mit Hilfe von zwei Pinzetten befreit und in einem Metallsieb das dem Bodenteil einer Petrischale (6cm) auflag, zerrieben. Das Sieb wurde anschließend mit 10ml Medium gespült, der Siebinhalt verworfen und die aufgefangene Zellsuspension pelletiert (5min bei 1800rpm, 681xg). Wenn notwendig, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Die Zellen wurden dann zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2ml Medium aufgenommen und über das Zell-Nylonsieb filtriert. Um einen möglichen Zellverlust gering zu halten, wurde das Nylonsieb nochmals mit 2ml Medium nachgespült und danach die Zellzahl bestimmt.

### 2.2.7.2 Milz

Durchführung:

Die entnommenen Milzen wurden in ein mit RPMI gefülltes 4ml Röhrchen überführt. Dann wurden die Organe auf einem Metallsieb zerrieben, das dem Bodenteil einer Petrischale (6cm) auflag. Das Sieb wurde anschließend mit Medium gespült, der Siebinhalt verworfen und die aufgefangene Zellsuspension pelletiert (5min bei 1800rpm, 681xg). Zur Erythrozytenlyse wurde das Pellet in RBLB (1,5ml/Milz) resuspendiert und 1½min bei RT geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und zweimal mit 4ml Medium gewaschen. Dann wurden die Zellen in 2-4ml Medium aufgenommen, über Gaze filtriert und das Volumen der Zellsuspension bestimmt. Anschließend wurden die Milzzellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die erwartete Zellzahl für ein 8 Wochen altes unbehandeltes Tier liegt bei etwa  $1 \times 10^8$  Zellen/Milz.

### 2.2.8 Anlage von MEF zur mCMV-Produktion

Aufgrund ihrer guten Infizierbarkeit mit murinem Cytomegalovirus wurden murine embryofetale Fibroblasten für die Virusproduktion verwendet.

Material:

- steriler 300ml Erlenmeyerkolben mit Glaskugeln ( $\varnothing$  1-2mm) und magnetischer Rührfisch für den Magnetrührer
- steriles Metallsieb
- steriles mit Gaze bespanntes Gefäß
- PBS (eisgekühlt)
- MEM + 5%FCS
- Trypsin/EDTA-Lösung

Durchführung:

Einer trächtigen Maus wurden am 17. Tag der Schwangerschaft die Föten steril entnommen und diese sofort in einer Petrischale auf Eis gestellt. Die inneren Organe sowie die Augenanlagen der Embryonen wurden entfernt. Das verbliebene Gewebe wurde mit einer Schere sehr klein geschnitten. Anschließend wurde der Zellbrei in kaltem PBS aufgenommen, über ein Metallsieb gegeben und mit PBS nachgespült, um die Erythrozyten zu entfernen. Dann wurde der Zellbrei mit Hilfe eines Zellschabers in einen Erlenmeyerkolben mit den Glasperlen und dem Magnetrührfisch überführt. Bevor das Volumen, auf 30ml, mit Trypsin/EDTA-Lösung aufgefüllt wurde, wurde das Metallsieb mit dieser Lösung abgespült, um den Zellverlust möglichst gering zu halten.

Nach langsamem Rühren für 30min bei 37°C wurden noch zweimal je 30ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und jeweils für 30min bei 37°C weiter gerührt. Nach insgesamt 1½h wurde der Überstand abgenommen, erneut über ein Metallsieb gegeben und das Filtrat abzentrifugiert (10min bei 1200rpm, 302xg). Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Pellet in Medium aufgenommen und die Zellsuspension wurde zur Entfernung von Gewebestücken über Gaze filtriert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Dichte von  $3-5 \times 10^7/30\text{ml}$  pro Petrischale ( $\varnothing$  15cm) ausgesät (1. Passage).

Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um alle nicht adhärenen Zellen, wie z. B. Erythrozyten zu entfernen.

Nachdem sich nach 2 bis 4 Tagen ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen entweder eingefroren (Einfriermedium: 90%FCS + 10%DMSO) oder durch Teilen in die zweite Passage überführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, 3ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben, dann wieder abgesaugt, wieder 1-2ml Trypsin

zugegeben und bei RT unter ständiger Kontrolle abgewartet, bis sich die Zellverbände zu lösen begannen. Anschließend wurde die Zellsuspension in Medium mit 5% FCS aufgenommen, weil Trypsin durch Proteaseinhibitoren im FCS inaktiviert wird. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellsuspensionen je einer Platte auf drei neue Schalen verteilt.

Grundsätzlich wurden die MEF zur mCMV-Produktion in der 3. Passage verwendet.

### 2.2.9 mCMV-Produktion und Virustiterbestimmung

Material:

- MEF der 3. Passage
- Medium: MEM + 10%FCS
- MEM (ohne Amphotericin)
- Lösungen: 15% (w/v) Sucrose in VSP [15g Sucrose/100ml VSP]
- Virus-Standard Puffer (VSP)
- Methylcellulosemedium
- sterile Metallsiebe

Durchführung:

MEF der 3. Passage wurden mit  $1-1,25 \times 10^5$  pfu mCMV pro Petrischale ( $\varnothing$  14,5cm) infiziert. Nach dem Absaugen des Mediums wurde das Virus in einem Volumen von 5ml zugegeben. Die Petrischalen wurden dann für 30min bei RT inkubiert und alle 5min geschwenkt. Anschließend wurden 15ml frisches Medium zupipettiert.

Nach 4-5 Tagen war der Zellrasen gut durchinfiziert und die Zellen kugelten sich ab (ca. 50% der Zellen im Überstand). Jetzt wurden Überstand und Zellen in sterilen 500ml Zentrifugenbechern gesammelt. Dabei wurden noch adhärente Zellen mit einer Pipette oder mit einem Zellschaber abgelöst. Es darf hierbei kein Trypsin verwendet werden, um das Virus zu schonen.

Dann wurde bei 6370xg und 4°C für 20min zentrifugiert (Beckmann J2-21, Rotor JA 10).

Ab jetzt erfolgten alle Aufarbeitungsschritte auf Eis. Die Überstände wurden in sterilen 250ml Zentrifugenbechern gesammelt. Um die Pellets in 10ml Medium zu homogenisieren, wurde der Stempel des Dounce-Homogenisators 20mal auf und ab bewegt. Anschließend wurde das Homogenat in ein 50ml Röhrchen überführt und wieder zentrifugiert (20min/3630xg/4°C). Der Überstand wurde dann mit den bereits gesammelten Überständen vereinigt. Die aus Zelltrümmern bestehenden Pellets

wurden verworfen. Eine anschließende 3-stündige Zentrifugation bei 25930xg und 4°C (Beckmann J2-21, Rotor JA 14) folgte. Die Pellets wurden über Nacht auf Eis (Kühlraum) gestellt.

Am nächsten Tag wurden die Pellets im verbliebenen Medium resuspendiert und auf Eis nochmals auf die o. g. Art homogenisiert (wieder 20mal). Danach wurde das Homogenat (5ml/Virus) vorsichtig auf ein kaltes 15%iges Sucrose/VSP-Kissen gegeben (20ml Polyallomerröhrchen). Bei 22,5ml Sucrose/VSP und 2,5ml Virussuspension entspricht dies einem Verhältnis von Puffer zu Virus von 10:1. Dann wurde für 1h bei 52800xg und 4°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Rotor SW 28). Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, das Pellet mit 2-4ml Sucrose/VSP überschichtet und 2-4h oder über Nacht auf Eis gestellt.

Dann wurde das Viruspellet mit einer Pasteurpipette für 15min resuspendiert, eventuell nochmals homogenisiert und in 20-100µl Aliquots bei -70°C eingefroren.

Gereinigtes Virus kann unverdünnt bis zu dreimal aufgetaut werden, ohne dass der Virustiter signifikant abnimmt. Virusverdünnungen sollten nicht wieder eingefroren werden.

Zur Virustiterbestimmung wurden MEF der 3. oder 4. Passage in 48-Loch-Platten angelegt. Zur Verdünnung des Virusstocks wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen je 450µl Medium vorgelegt, 50µl Virusstock in das erste Reaktionsgefäß gegeben, gut gemischt, davon 50µl in das zweite pipettiert usw. Es wurden 6-8 Verdünnungsstufen (1:10) hergestellt, wobei jedes Mal die Pipettenspitze gewechselt wurde. Die gesamte Virustitration erfolgte auf Eis.

100µl jeder Verdünnungsstufe wurde in ein *Well* mit konfluenten MEF pipettiert – jeweils als Duplikat bzw. Triplikat – aus dem bis auf einen kleinen Rest das Medium abgesaugt worden war.

Anschließend wurde 1h bei 37°C inkubiert, dann mit jeweils 0,5ml Methylcellulosemedium überschichtet und nach 4 Tagen der Virustiter abgelesen:

1. Verdünnungsstufe: Plaquezahl x 10<sup>2</sup>
  2. Verdünnungsstufe: Plaquezahl x 10<sup>3</sup>
  3. Verdünnungsstufe: Plaquezahl x 10<sup>4</sup> = Titer/ml
- usw.

Die Wiederholungen (Duplikate bzw. Triplikate) wurden dabei gemittelt. Die errechneten Werte ergaben dann den Virustiter pro ml (Reddehase et al., 1985).

### 2.2.10 Knochenmarktransplantation und Infektion

Mit dem murinen KMT-Modell kann man die Pathogenese einer mCMV-Infektion experimentell untersuchen (Koszinowski et al., 1990; Reddehase et al., 1991). Dazu wurde das hämatopoetische System der Inzuchtmäuse (BALB/cJ) durch Bestrahlung zerstört. Zur anschließenden Rekonstitution wurde dann Knochenmarkzellen von Donortieren transplantiert. Wahlweise erfolgte zusätzliche eine Infektion mit mCMV. (*Smith strain*, ATCC VR-194, *mouse salivary gland virus*) (Smith et al., 1954).

#### Material:

- 10ml, 2ml und 1ml Spritzen
- Kanülen
- RPMI + 5%FCS
- RPMI (ohne Zusätze) oder PBS
- mCMV gereinigt

#### Durchführung:

Die Knochenmarkzellen (KMZ) von BALB/cJ-Donortieren wurden gewonnen, wie unter 2.2.6 beschrieben und auf eine Zellzahl zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  (je nach Versuch) pro 0,5ml RPMI (ohne Zusätze) eingestellt.

Die Rezipientenmäuse (BALB/cJ) wurden zur Immunsuppression in einer Kleintierbestrahlungsanlage (Cäsium-Quelle:  $^{137}\text{Cs}$ ) mit einer Dosis von 6 Gy oder 7 Gy bestrahlt.

Anschließend wurden die KMZ den Mäusen intravenös (i. v.) in die Schwanzvene injiziert.

Kurz vor der Infektion wurde der Virusstock in RPMI (ohne Zusätze) oder PBS auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  pfu in  $25 \mu\text{l}$  pro Maus eingestellt. Bis zur Verwendung wurde die Infektionslösung auf Eis gestellt. Den Mäusen wurde das Virus nach der KMT intraplantar in eine Hinterpfote injiziert.

### 2.2.11 Vorbereitung der Organe für die histologischen Färbungen

Um die Größe der Tumorfoci in den infizierten und nicht infizierten Tieren *in situ* im Zeitverlauf vergleichen zu können, wurde die Leber histologisch untersucht.

In einigen Versuchen wurden noch weitere Organe untersucht: Milz, Niere, Lunge, Herz, Gehirn, Ovarien, Wirbelsäule, Retroperitoneumgewebe, Nebenniere, Speicheldrüse und Femur.

### 2.2.11.1 Einbetten und Schneiden der Organe

Für die histologischen Färbungen wurde die Einbettung in Paraffin gewählt, da diese eine sehr gute Strukturhaltung der Gewebe ermöglicht. Nachdem die Organe entnommen worden waren, wurden sie 18 Stunden in einer 4%igen wässrigen Formalinlösung fixiert.

Anschließend wurden die Organe, mit Ausnahme der Femora, für 2h in Leitungswasser gespült. Dann wurden die Organe in einer aufsteigenden so genannten Alkoholreihe (Isopropanol in verschiedenen Konzentrationen) dehydriert, in Xylol inkubiert und in Paraffin eingebettet. Die einzelnen Inkubationsschritte sind folgende:

- Isopropanol, 20%, 45min
- Isopropanol, 40%, 45min
- Isopropanol, 60%, 45min
- Isopropanol, 80%, 45min
- Isopropanol, 90%, 45min
  
- 1. Isopropanol, 100%, 45min
- 2. Isopropanol, 100%, 45min
- 3. Isopropanol, 100%, 45min
  
- 1. Xylol, 1h
- 2. Xylol, 1h
- 3. Xylol, 1h
  
- 1. Paraffin, 55°C, 4h
- 2. Paraffin, 55°C, 8-16h
- 3. Paraffin, 55°C, 4h
- in heissem Paraffin (50-70°C) einblocken

Die Femora wurden nach der Fixierung zusätzlich noch zwei alternativen Entkalkungsprozessen unterzogen. Zur Entkalkung wurden die Femora entweder in EDTA oder in Trichloressigsäure (TCA) für 24h bei RT inkubiert. Die EDTA-behandelten Femora wurden dann für 2h gewässert und ebenfalls in o. g. Weise behandelt und eingeblockt.

Die TCA-behandelten Femora wurden nach ihrer Entkalkung 4mal für 1h in 96%igem Ethanol gespült (um Schrumpfungartefakte zu reduzieren) und über die Xylolreihe in Paraffin eingebettet (s. o.). Es wurden zwei Entkalkungsarten gewählt, weil die EDTA-Behandlung gute Ergebnisse bei Nukleinsäure-Nachweisverfahren (*in*

*situ*-Hybridisierung) liefert und andererseits die TCA-Behandlung für die Immunhistologie zu optimalen Ergebnissen führt.

Zum Schneiden der Blöckchen wurden diese bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und am Mikrotom geschnitten. Die Schnittdicke betrug  $2\mu\text{m}$ . Die Serienschnitte wurden zuerst im Kaltwasserbad ( $20^{\circ}\text{C}$ ) aufgefangen und dann im Warmwasserbad ( $40^{\circ}\text{C}$ ) gestreckt, um auf einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Über Nacht wurden die Objektträger im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

#### 2.2.11.2 Entparaffinierung der Schnitte

Bevor die Schnitte einer Färbung unterzogen werden können, müssen sie Paraffin-frei gemacht werden.

Durchführung:

- 1. Xylol, 5min
- 2. Xylol, 5min
- 3. Xylol, 5min
  
- 1. Isopropanol, 100%, 3min
- 2. Isopropanol, 100%, 3min
- Isopropanol, 90%, 3min
- Isopropanol, 70%, 3min
- Isopropanol, 50%, 3min
  
- A. bidest., 2min

Nachdem die Schnitte entparaffiniert waren, wurden sie den verschiedenen Färbungen zugeführt.

#### 2.2.11.3 Kryostat-Histologie

Für die Anfertigung von Kryostatschnitten musste das zu untersuchende Gewebe zunächst als kleines Stückchen mit wenigen mm Kantenlänge in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die weitere Zwischenlagerung kann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgen.

Eine Fixierung des Gewebestückchens vor dem Schneiden, wie bei der Paraffinhistologie, erfolgt nicht. Direkt vor dem Schneiden wurden die Gewebe auf

einen Halter mit einem speziellen „Gewebeeinbettmedium für Gefrierschnitte“ fixiert. Am Kryostat wurden Schnitte von 5µm angefertigt und die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung der Schnitte für 10min in einem eiskalten Aceton/Metanol-Gemisch (1:2). Nachdem die Schnitte luftgetrocknet waren, erfolgte eine zweite Fixierung. Wurden die Schnitte nicht sofort weiterverarbeitet, wurden sie trocken und luftdicht verpackt und bei –20°C gelagert. Die Kryostatschnitte wurden für X-Gal-Färbungen verwendet.

## 2.2.12 Histologische Färbungen

### 2.2.12.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Mit der Hämatoxylin/Eosin- (HE-) Färbung lässt sich eine gute Übersichtsfärbung erzielen. Hier färben sich Kerne blau-violett, während Zytoplasma und intrazelluläre Substanzen rosa erscheinen.

Durchführung:

- Hämalaun nach Mayer, 10min (je nach Organ)
- Spülen in Leitungswasser bis keine Farbwolken mehr abgehen
- Differenzieren in 2%HCl-Alkohol (2ml 25%iges HCl in 100ml 70%igem Ethanol), 2sec
- Bläuen, 5min in Leitungswasser
- Eosin-Färbelösung, 2sec
- In Isopropanol (1mal 100%, 2mal 90%) schwenken, jeweils 2sec
- Trocknen
- 3mal in Xylol schwenken
- Eindecken mit Entellan

### 2.2.12.2 mCMV-IE1-Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ermöglicht den Nachweis von Antigenen im Schnitt eines Organs auf einem Objektträger. Dazu benötigt man spezifische Antikörper, die an das Antigen binden.

Die mCMV-Immunhistochemie wurde mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Färbung (sog. ABC-Peroxidase-Methode) durchgeführt, die ein hochsensitiver Nachweis für *in situ*-Antigene ist. Als Substrat dient Diaminobenzidin (DAB) in Verbindung mit

Nickel, das zu einer Schwarzfärbung des Gewebes an der Stelle des Antigens führt. Mit dieser Methode wurden die Organe auf das virale IE1-Protein (pp89) untersucht.

Durchführung:

- Inkubation in Trypsin für 15min bei 37°C
- Spülen in A. bidest., 3mal 1min; danach
- Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Block, 35min bei RT (30ml Methanol, 30ml PBS und 1ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Spülen in TBS, 3mal 1min
- Inkubation in NS Kaninchen, Verd. 1:10 in BSA-TBS (1%), 20min in feuchter Kammer. Danach nur abschütten, nicht waschen.
- Inkubation im 1. Ak: anti-mCMV (Croma 101), Verd. 1:500 in BSA-TBS (1%), sowie 1:10 NS Kaninchen
- Spülen in TBS, 3mal 1min
- Inkubation im 2. Ak: Ziege  $\alpha$ -Maus IgG-(Fab-)Biotin, Verd. 1:200 in BSA-TBS (1%), 30min in feuchter Kammer
- ABC anmischen (10 $\mu$ l Reagenz A und 10 $\mu$ l Reagenz B in 1ml BSA-TBS (1%ig) und bei RT 30min inkubieren)
- Spülen in TBS, 3mal 1min
- ABC-Peroxidase-Inkubation, 30min in feuchter Kammer
- Spülen in TBS, 3mal 10min
- spezifische Färbung für 10min  
Dazu werden 10mg DAB und 75mg Nickelsulfat in 50ml Trispuffer (50mM) gelöst und filtriert. Anschließend werden 17 $\mu$ l 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben.
- Anschließend Gegenfärbung mit Hämalaun, 3sec (Knochen: 10sec)
- Dehydrieren in der „aufsteigenden“ Isopropanolreihe (1mal 50%, 1mal 70%, 1mal 90%, 2mal 100%), jeweils 30sec
- dann Trocknen, anschließend
- 3mal in Xylol schwenken
- mit Entellan und einem Deckgläschen eindecken

### 2.2.12.3 Doppelfärbung: B220 und mCMV-Immunhistochemie

Für eine Doppelfärbung benötigt man zwei Tage. Zu der bereits vorgestellten ABC-Peroxidase-Methode kommt ein Färbeschritt mit der alkalischen Phosphatase hinzu. Dieser ist im Vergleich zur ABC-Peroxidase-Methode weniger sensitiv. Bei der Doppelfärbung wird das virale Protein pp89 rot (APAAP-Methode) und B220-Zellen (ABC-Methode) schwarz gefärbt. Hiermit kann geklärt werden, ob Tumorzellen *in vivo* infiziert werden können (Onkolyse).

Zur Detektion der B-Zellen mussten die Formalin-fixierten Paraffinschnitte durch Erhitzen in der Mikrowelle vorbehandelt werden. Man vermutet, dass dabei die durch die Fixierung maskierten und damit verloren gegangenen Konformationsepitope renaturiert werden.

Durchführung:

- Demaskierung der Schnitte in der Mikrowelle in Citrat-Puffer: Hierzu wurden die Schnitte in ein Mikrowellen-geeignetes Gefäß gestellt und etwa 1min sprudelnd gekocht (100% Leistung). Um Siedeverzug zu vermeiden, ist nach Einsetzen der Blasenbildung mit reduzierter Mikrowellenleistung (30% Leistung) weitergekocht worden.
- Spülen in A. bidest., 2mal 1min
- Inkubation in Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Block, 35min bei RT (30ml Methanol, 30ml PBS und 1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Spülen in TBS, 2mal 1min
- Inkubation in Avidin-Biotin-Block #1: 20 bei RT, dann mit TBS waschen
- Inkubation in Avidin-Biotin-Block #2: 20 bei RT, dann mit TBS waschen
- Inkubation in NS Ziege, Verd. 1:10 in BSA-TBS (1%), 20min in feuchter Kammer danach nur abschütten, nicht waschen
- Inkubation im 1. Ak:  $\alpha$ -B220, Verd. 1:1000 in BSA-TBS (1%), O/N in feuchter Kammer im Kühlschrank oder 1h bei RT in feuchter Kammer
- Spülen in TBS, 2mal 1min
- Inkubation im 2. Ak:  $\alpha$ -Ratte-Biotin, Verd. 1:100 in BSA-TBS (1%), 30min in feuchter Kammer
- ABC anmischen (10 $\mu$ l Reagenz A und 10 $\mu$ l Reagenz B in 1ml BSA-TBS (1%ig) und bei RT 30min inkubieren)
- Spülen in TBS, 3mal 1min
- ABC-Peroxidase-Inkubation, 30min in feuchter Kammer

- Spülen in TBS, 3mal 10min
- spezifische Färbung für 10min  
Dazu werden 10mg DAB und 75mg Nickelsulfat in 50ml Trispuffer (50mM) gelöst und filtriert. Anschließend werden 17µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben,
- kann über Nacht lufttrocknen, andernfalls mit TBS waschen
- Inkubation in Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Block, 35min bei RT (60ml Methanol und 0,6ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Spülen in A. bidest., 3mal 3min
- Spülen in TBS, 2mal 1min
- Inkubation in NS Kaninchen, Verd. 1:10 in BSA-TBS (1%), 20min in feuchter Kammer
- danach nur abschütten, nicht waschen
- Inkubation im 1. Ak: anti-mCMV-IE1 (Croma 101), Verd. 1:500 in BSA-TBS (1%), 1h in feuchter Kammer bei 37°C
- Spülen in TBS, 2mal 1min
- Inkubation im 2. Ak: Ziege α-Maus, Verd. 1:20 in BSA-TBS (1%), 30min in feuchter Kammer
- Spülen in TBS, 2mal 1min
- Inkubation im APAAP-Komplex-Maus, Verd. 1:50 in BSA-TBS (1%), 30min in feuchter Kammer
- Spülen in TBS, 3mal 10min
- Färbung mit dem Neufuchsin-Kit, 10-20min
  - Je 1 Tropfen C und D mischen und für 3min inkubieren.
  - Dann 1 Tropfen A mit 2ml Aqua dest. mischen und 1 Tropfen B hinzugeben.
  - Anschließend C/D und A/B miteinander mischen.
- Gegenfärbung mit Hämalaun, 3sec (Knochen: 10sec)
- Dehydrieren in der „aufsteigenden“ Isopropanolreihe (1mal 50%, 1mal 70%, 1mal 90%, 2mal 100%), jeweils 30sec
- Dann Trocknen, anschließend
- 3mal in Paraclear® schwenken
- mit Paramount® und einem Deckgläschen eindecken

#### 2.2.12.4 Aktive Caspase 3-Immunhistochemie

Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, ist ein essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und steht damit der Zellteilung als negativ regulierender Mechanismus gegenüber. Während der Apoptose aktiviert die Zelle ein internes Zerstörungsprogramm, dessen charakteristische Merkmale Veränderungen an der Plasmamembran, die Kondensierung des Zellkernes, der Abbau der Kern-DNA, die Bildung apoptotischer Körperchen, sowie die darauf folgende Phagozytose der Zellreste durch Nachbarzellen ohne Entzündungsreaktion, sind.

Im vielzelligen Organismus ist die Apoptose ein natürlicher Bestandteil der Ontogenese und unter anderem an der Entwicklung der Organe beteiligt, außerdem ist die Apoptose an der Beseitigung von gealterten, sowie infizierten oder mutierten Zellen und somit Tumorzellen beteiligt. Die Apoptose führt zu einer effizienten Elimination von unerwünschten Zellen.

Die Haupteffektoren der Apoptose sind Aspartat-spezifische Proteasen, die so genannten Caspasen. Aktivierte Caspase-3 degradiert Apoptose-spezifische Substrate in der Zelle und führt damit zum Abbau der Zelle in den späten Schritten der Apoptose. Letztlich steht die Aktive Caspase-3 am Ende mehrerer Kaskaden als zentrales Enzym und degradiert gezielt spezifische zelluläre Substrate und führt damit zum Tod der Zelle. Somit wurde als Apoptose-Färbung die Aktive Caspase-3-Immunhistochemie ausgewählt.

Durchführung:

- Demaskierung der Schnitte in der Mikrowelle in Citrat-Puffer: Hierzu wurden die Schnitte in ein Mikrowellen-geeignetes Gefäß gestellt und etwa 1min sprudelnd gekocht (100% Leistung). Um Siedeverzug zu vermeiden, ist nach Einsetzen der Blasenbildung mit reduzierter Mikrowellenleistung (30% Leistung) weitergekocht worden.
- Spülen in A. bidest., 2mal 1min
- Inkubation in Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Block, 35min bei RT (30ml Methanol, 30ml PBS und 1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Spülen in TBS, 2mal 1min
- Inkubation in Avidin-Biotin-Block #1: 20 bei RT, dann mit TBS waschen
- Inkubation in Avidin-Biotin-Block #2: 20 bei RT, dann mit TBS waschen
- Inkubation in NS Ziege, Verd. 1:10 in BSA-TBS (1%), 20min in feuchter Kammer danach nur abschütten, nicht waschen

- 
- Inkubation im 1. Ak:  $\alpha$ -aktive Caspase 3, Verd. 1:75 in BSA-TBS (1%), O/N in feuchter Kammer im Kühlschrank oder 1h bei RT in feuchter Kammer
  - Spülen in TBS, 2mal 1min
  - Inkubation im 2. Ak:  $\alpha$ -Kaninchen-Biotin, Verd. 1:500 in BSA-TBS (1%), 30min bei RT in feuchter Kammer
  - ABC anmischen (10 $\mu$ l Reagenz A und 10 $\mu$ l Reagenz B in 1ml BSA-TBS (1%ig) und bei RT 30min inkubieren)
  - Spülen in TBS, 3mal 1min
  - ABC-Peroxidase-Inkubation, 30min in feuchter Kammer
  - Spülen in TBS, 3mal 10min
  - spezifische Färbung für 10min  
Dazu werden 10mg DAB in 50ml Trispuffer (50mM) gelöst und filtriert. Anschließend werden 17 $\mu$ l 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben.
  - Anschließend Gegenfärbung mit Hämalaun, 3sec (Knochen: 10sec)
  - Dehydrieren in der „aufsteigenden“ Isopropanolreihe (1mal 50%, 1mal Färbung mit der Peroxidase, 8-12min
  - Dann Trocknen, anschließend
  - 3mal in Xylol schwenken
  - mit Entellan und einem Deckgläschen eindecken

### 2.2.12.5 PCNA-Immunhistochemie

Die Zellproliferation von Tumorzellen wurde mittels des PCNA- (*proliferating cell nuclear antigen*-) Markers nachgewiesen. Die zeitliche Besonderheit der PCNA-Expression in der Zelle macht es zu einem idealen Marker für die Zellproliferation. PCNA wird während der Phase G1 des Zellzyklus verstärkt exprimiert und ist während der S Phase reichlich vorhanden, erst in der G2/M Phase nimmt die Expression ab (Kurki et al., 1988; Hall et al., 1990). Da die Halbwertszeit von PCNA 20 Stunden übersteigt, ist es möglich damit das Protein in Zellen nachzuweisen, die nicht proliferieren.

Durchführung:

- Demaskierung der Schnitte in der Mikrowelle in Citrat-Puffer: Hierzu wurden die Schnitte in ein Mikrowellen-geeignetes Gefäß gestellt und etwa 1min sprudelnd gekocht (100% Leistung). Um Siedeverzug zu vermeiden, ist nach Einsetzen der Blasenbildung mit reduzierter Mikrowellenleistung (30% Leistung) weitergekocht worden.
- Spülen in A. bidest., 2mal 1min
- Inkubation in Methanol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Block, 35min bei RT (30ml Methanol, 30ml PBS und 1ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Spülen in TBS, 2mal 1min
- Inkubation in Avidin-Biotin-Block #1: 20 bei RT, dann mit TBS waschen
- Inkubation in Avidin-Biotin-Block #2: 20 bei RT, dann mit TBS waschen
- Inkubation in NS Ziege, Verd. 1:10 in BSA-TBS (1%), 20min in feuchter Kammer danach nur abschütten, nicht waschen
- Inkubation im 1. Ak:  $\alpha$ -PCNA, Verd. 1:25 in BSA-TBS (1%), O/N in feuchter Kammer im Kühlschrank oder 1h bei RT in feuchter Kammer
- Spülen in TBS, 2mal 1min
- Inkubation im 2. Ak: Ziege Ratte  $\alpha$ -Maus IgG (Fab)-Biotin, Verd. 1:300 in BSA-TBS (1%), 30min bei RT in feuchter Kammer
- ABC anmischen (10 $\mu$ l Reagenz A und 10 $\mu$ l Reagenz B in 1ml BSA-TBS (1%ig) und bei RT 30min inkubieren)
- Spülen in TBS, 3mal 1min
- ABC-Peroxidase-Inkubation, 30min in feuchter Kammer

- Spülen in TBS, 3mal 10min
- spezifische Färbung für 10min  
Dazu werden 10mg DAB in 50ml Trispuffer (50mM) gelöst und filtriert.  
Anschließend werden 17µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben.
- Anschließend Gegenfärbung mit Hämalaun, 3sec (Knochen: 10sec)
- Dehydrieren in der „aufsteigenden“ Isopropanolreihe (1mal 50%, 1mal Färbung mit der Peroxidase, 8-12min
  
- Dann Trocknen, anschließend
- 3mal in Xylol schwenken
- mit Entellan und einem Deckgläschen eindecken

#### 2.2.12.6 X-Gal-Färbung (Kryostatschnitte)

Die frisch angesetzte X-Gal-Färbelösung (aus Kap. 2.2.3) wurde auf die Objektträger aufgetragen und in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde mit Kernechtrolösung (1g/l) gegengefärbt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte bei RT für ca. 1h.

Anschließend erfolgte das Eindecken der Kryostatschnitte:

- Aufsteigende Isopropanolreihe (1mal 50%, 1mal 70%, 1mal 90%, 2mal 100%), jeweils 30sec und trocknen
- Inkubation in Paraclear<sup>®</sup> für 5sec
- Eindecken mit Paramount<sup>®</sup>

#### 2.2.13 Histomorphometrische Analyse der Tumorfoci

Die Auswertung der immunhistologischen B220-Färbungen erfolgte unter anderem mit einem Stereomikroskop (Olympus SZX 12). Dazu wurde in der 3,5fachen Vergrößerung ein Bild des histologischen Leberpräparates mit einer digitalen Videokamera (3x12 bit „color view12“) aufgenommen. Die Auswertung der

Leberflächen bzw. Tumorflächen, erfolgte mit der Flächenberechnung des Software-Programms „analySIS 3.0“ (Software Imaging Systems GmbH, Münster).

Für jede Leber wurde die Anzahl und Größe der Tumorfoci in 100mm<sup>2</sup> Lebergewebe bestimmt. Der prozentuale Anteil der Tumorfläche im Verhältnis zur Leberfläche wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumorfläche}/(\text{Leberfläche} + \text{Tumorfläche}) = \text{relativer Tumoranteil in \%}$$

Die Tumorfoci wurden anhand ihrer Größe in 10 Klassen eingeteilt, wobei die obere Grenze der jeweiligen Größenklasse sich zur nächst höheren Kategorie jeweils verdoppelt (Logarithmus zur Basis 2), beginnend mit einer Fläche von bis zu 0,05mm<sup>2</sup>. Ein Tumor dieser Fläche entsprach ungefähr 400 Tumorzellen und war in der höchsten Vergrößerung im Stereomikroskop Olympus SZX12 gerade noch sichtbar.

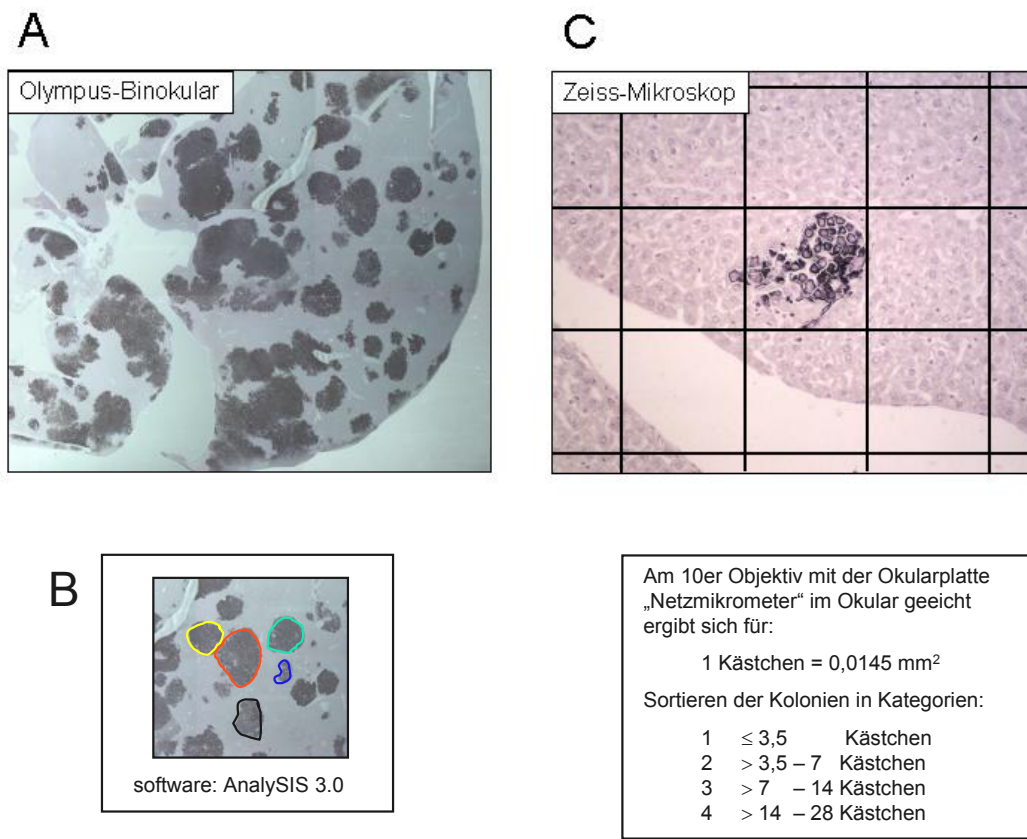
In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Klassen dargestellt. Mit dem Flächenberechnungsprogramm wurde dann ermittelt, wie viele Foci in die jeweiligen Größenklassen fallen und die Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms dargestellt (siehe Ergebnisteil Kap. 3.4.2).

**Tab. 3: Einteilung der Tumoren in die Größenklassen**

Klasse	1	2	3	4	5
Tumorfläche [mm <sup>2</sup> ]	< 0.05	≥ 0.05 < 0.1	≥ 0.1 < 0.2	≥ 0.2 < 0.4	≥ 0.4 < 0.8

Klasse	6	7	8	9	10
Tumorfläche [mm <sup>2</sup> ]	≥ 0.8 < 1.6	≥ 1.6 < 3.2	≥ 3.2 < 6.4	≥ 6.4 < 12.8	≥ 12.8

Anhand der folgenden Abbildung soll verdeutlicht werden, wie die Tumorkolonien in einem immunhistologischen Schnitt vermessen wurden. Große Tumoren im Schnitt können mittels der Software AnalySIS 3.0 am Binokular ausgemessen werden. Mit dieser Methode sind Tumorkolonien ab einer Größe von 0,2mm<sup>2</sup> verlässlich messbar. Dies entspricht den Tumorkolonien ab Kategorie IV.



### Abbildung 8: Vermessen der Tumorkolonien mit Binokular und Mikroskop.

(A) Bild eines immunhistologischen Schnittes, wie man es im Binokular sieht (IHC B220, schwarz). (B) Markieren und Vermessen der Tumorkolonien (> Kategorie 3) mittels des Softwareprogramms AnalySIS 3.0. (C) Bild eines immunhistologischen Schnittes, wie man es im Mikroskop sieht (IHC B220, schwarz). Anhand der Kästchen (Netzmikrometer) wird die Fläche des Tumorfocuses abgeschätzt (hier 1 Kästchen = Kategorie 1). Mit dieser Methode wurden Tumorkolonien gezählt, die kleiner oder gleich Kategorie 4 sind.

Außerdem wurde hiermit die Gesamtfläche des untersuchten Schnittes bestimmt, um nach der Zählung der Tumorkolonien die Ergebnisse auf 100mm<sup>2</sup> eichen zu können.

Für die meisten Versuche, insbesondere für die Kurzzeitversuche bis Tag 12 war es ausreichend, die Kolonien mit dem Mikroskop zu messen und zu zählen. Dazu wurde die Fläche mit einem speziellen Okular, in welches ein Netzmikrometer eingelegt ist, bestimmt. Dabei ergibt sich im 10er Objektiv nach Eichung mit einem Objektmikrometer (Zeiss, #474026) für ein Kästchen eine Fläche von 0,0145mm<sup>2</sup>.

In der Abbildung 8 (Teilbild C) wäre die gemessene Größe der Kolonie 1 Kästchen, also Kategorie 1 (≤3,5 Kästchen entsprechen einer Fläche von <0,05mm<sup>2</sup>).

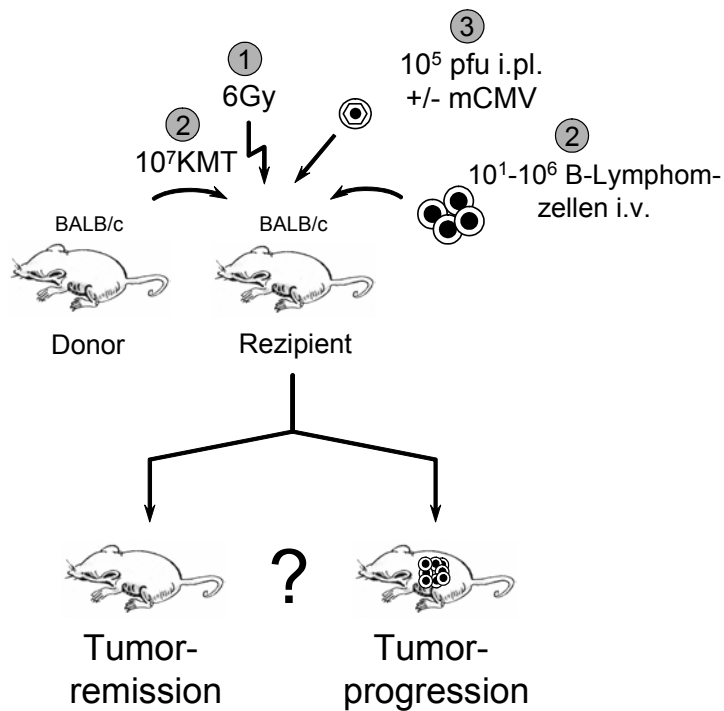
### **3 Ergebnisse**

Bis heute gibt es nur wenige Untersuchungen über einen möglichen Zusammenhang zwischen CMV-Infektion und Tumorrezidiven nach hämatoablativer Behandlung und KMT (Fujiwara, 2000; Fujiwara, 2001; Erlach et al., 2002). Um diesen Zusammenhang näher untersuchen zu können, etablierten wir ein experimentelles System in der BALB/c-Maus, basierend auf dem Modell einer mCMV-Infektion nach syngener KMT (Reddehase et al., 1985; Holtappels et al., 1998; Podlech et al., 1998; Steffens et al., 1998a; Steffens et al., 1998b; Podlech et al., 2000) und anschließender Gabe von murinen B-Lymphomzellen.

#### **3.1 Abhängigkeit der A20-Tumorletalität im KMT-Modell von der initialen Tumorzellzahl und mCMV-Infektion**

In einem ersten Versuch sollte der Einfluss einer unterschiedlichen Tumorlast (Tumorload) auf das Überleben der Tiere untersucht werden. Als Rezipiententiere wurden weibliche acht bis neun Wochen alte, BALB/cJ-Mäuse verwendet. Diese wurden morgens mit 6 Gy bestrahlt und erhielten etwa vier Stunden später  $10^7$  KMZ und eine variierende Zahl von Tumorzellen. Die KM- und Tumorzellen wurden gemischt und den Tieren zusammen intravenös injiziert. Fünfzig Prozent der Tiere wurden 1½ Stunden nach KM- und Tumorgabe mit  $10^5$  pfu mCMV in die Fußsohle (i. pl.) infiziert (Abb.9).

Bei den gewählten Transplantationsbedingungen ist in Abwesenheit von Tumor die Chance für das Überleben der Tiere sehr gut. Die Infektion mit  $10^5$  pfu mCMV unter diesen Versuchsbedingungen verursacht eine nur leichte CMV-Erkrankung in den Tieren.



**Abbildung 9: Titration der Tumorzellen.**

Für die syngene KMT wurden Tiere des BALB/cJ-Stammes als Rezipienten und Donoren verwendet. Die hämatoablativ Behandlung der Tiere erfolgte mittels gamma-( $\gamma$ -)Bestrahlung der Tiere (6 Gy/Tier). Tiere erhielten syngene KMZ ( $10^7$ /Tier) und  $10^1$  bis  $10^6$  Tumorzellen des B-Zell-Lymphoms A20. Die Hälfte der Rezipienten wurde mit mCMV infiziert, die andere Hälfte wurde nicht infiziert (Kontrollgruppe). Die zeitliche Abfolge des Versuchsaufbaus ist durch die Zahlen in den Kreisen angezeigt.

Zur Ermittlung von tumorbedingter Mortalität und Morbidität wurden die Tiere täglich auf Krankheitsanzeichen überprüft und die Zahl der gestorbenen Tiere festgehalten. Krankheitsanzeichen sind ein struppiges Fell und das Zusammenkauern der Tiere. Sie zeigen nahezu keine Aktivität mehr und magern ab. Vereinzelt zeigt sich auch Ascites aufgrund einer Aussaat des Tumors in den Peritonealraum.

Die folgende Tabelle zeigt die Versuchsgruppen im einzelnen. Für jede Tiergruppe wurden 10 Mäuse verwendet:

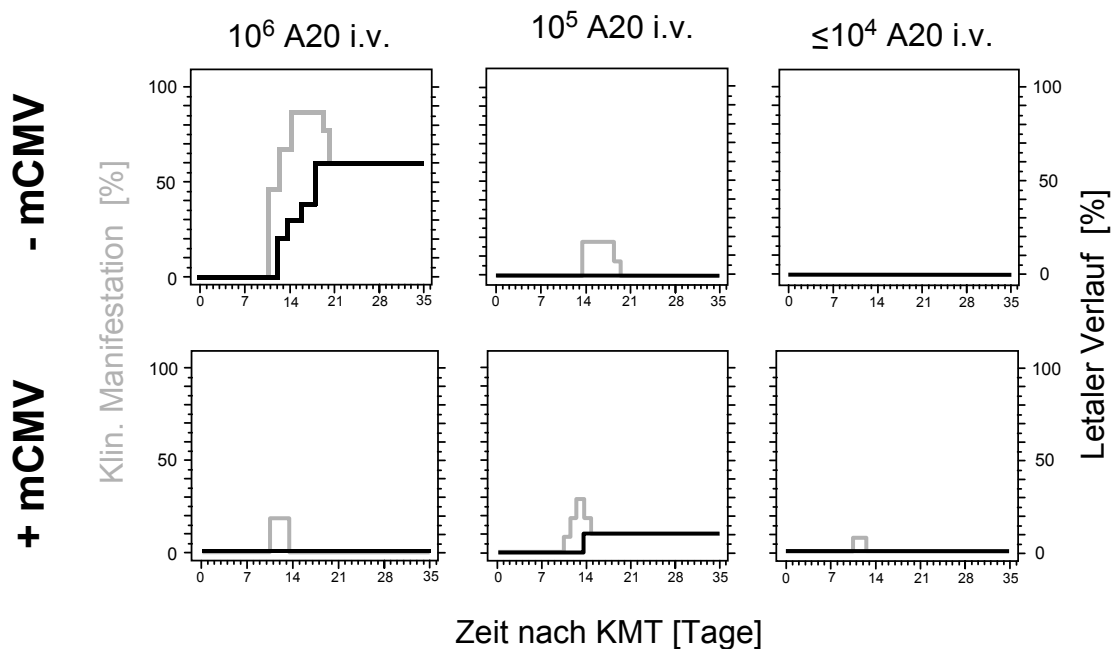
Tab. 4: Einteilung der Versuchsgruppen

Bezeichnung der Gruppe	Anzahl der gegebenen A20-Tumorzellen	Virus
A	$10^1$	$\emptyset$
B	$10^1$	$10^5$ pfu
C	$10^2$	$\emptyset$
D	$10^2$	$10^5$ pfu

Bezeichnung der Gruppe	Anzahl der gegebenen A20-Tumorzellen	Virus
E	10 <sup>3</sup>	∅
F	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup> pfu
G	10 <sup>4</sup>	∅
H	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup> pfu
I	10 <sup>5</sup>	∅
J	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> pfu
K	10 <sup>6</sup>	∅
L	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> pfu

Die Ergebnisse für die Tiere, die 10<sup>4</sup> oder weniger A20-Zellen erhielten (Gruppen A-H) wurden in zwei Bildern zusammengefasst (Abb. 10, letzte Spalte). In diesen Gruppen konnte im gesamten Untersuchungszeitraum kaum Morbidität und kein einziger Todesfall registriert werden. In der nicht infizierten Gruppe, in der die Tiere 10<sup>6</sup> Tumorzellen erhalten hatten, verstarben 60% der Tiere innerhalb der ersten drei Wochen, während in der Vergleichsgruppe mit 10<sup>6</sup> A20-Zellen und zusätzlicher mCMV-Infektion kein einziges Tier verstarb.

Der Versuch zeigte, dass unter den gewählten Bedingungen mindestens 10<sup>6</sup> A20-Zellen benötigt werden, um in den Tieren ein letales Tumorwachstum innerhalb der ersten 5 Wochen zu verursachen.



**Abbildung 10: Einfluss von verschiedenen A20-Zellzahlen auf das Überleben in KM-transplantierten Tieren.**

Obere Reihe: nicht infizierte Tiere; untere Reihe: infizierte Tiere. Links:  $10^6$  Tumorzellen (i.v.); Mitte:  $10^5$  Tumorzellen (i.v.); rechts:  $10^4$  (und Tiergruppen mit weniger als  $10^4$ ) Tumorzellen (i.v.). N = 10 Tiere/Gruppe.

Außerdem zeigte sich, dass es in der Gruppe L, die zusätzlich noch mit mCMV infiziert war, innerhalb der ersten 5 Wochen zu keinen Tumor-bedingten Todesfällen kam. Unter den gewählten Bedingungen verhinderte also die mCMV-Infektion eine letale Tumorprogression.

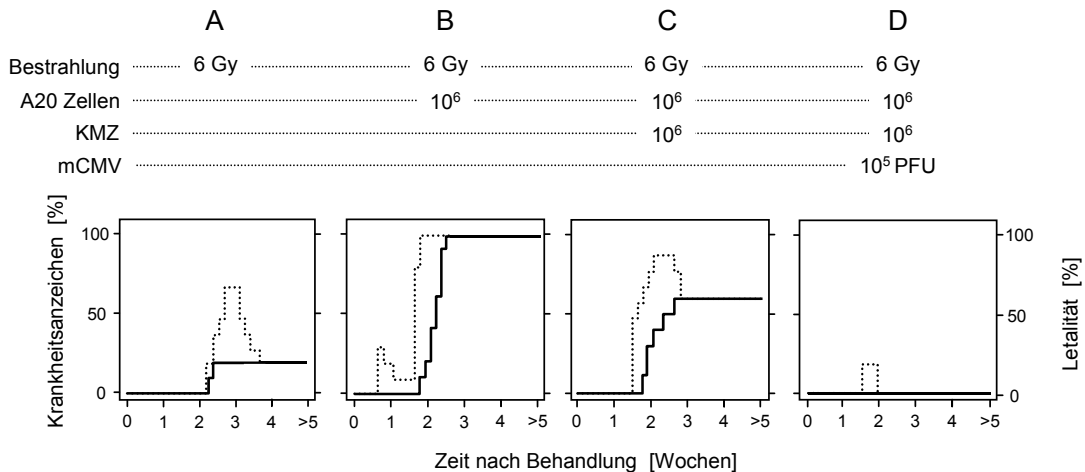
Es war damit erstmals gezeigt, dass die mCMV-Infektion einen antitumoralen Effekt hat.

### 3.2 Einfluss der KMT auf die A20-Tumorletalität

In diesem Versuch wollten wir nun klären, welchen Einfluss die KMT in infizierten und nicht infizierten Tieren auf das Tumorstadium hat.

Als Rezipienten wurden weibliche, acht bis neun Wochen alte BALB/cJ-Mäuse verwendet. Diese wurden mit 6 Gy bestrahlt (Gruppen A-D) und erhielten ca. vier

Stunden später KMZ und Tumorzellen (Gruppen C+D) oder nur Tumorzellen (Gruppe B). Wie im vorhergehenden Versuch wurden die KM- und Tumorzellen gemischt und den Tieren zusammen intravenös injiziert. Anschließend erfolgte die Infektion der Tiere intraplantar (Gruppe D).



**Abbildung 11: Pathogenität der A20 Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen.**

Die gepunktete Linie zeigt den Anteil der kranken Tiere, die durchgezogene Linie die Letalität. (A) hämatoablative Behandlung. (B) hämatoablative Behandlung und Tumorgabe. (C) wie (B), und zusätzlich KMZ. (D) wie (C), und zusätzlich mCMV. (A)-(D): N = 10 Tiere

Die nur bestrahlten Tiere zeigten eine Letalität von etwa 20% (Abb. 11A), bei zusätzlicher Gabe von 10<sup>6</sup> A20-Zellen kommt es während der 2. und 3. Woche zu einer Sterberate von 100% (Abb. 11B). Die Tumorzellen sind also in der Lage sich im immundefizienten Tier erfolgreich anzusiedeln und innerhalb von 3 Wochen den Tod aller Versuchstiere hervorzurufen. Werden diese Tiere allerdings durch KMZ rekonstituiert (Abb. 11C), kommt es zu einer teilweisen Kontrolle des Tumors – nur noch 60% der Tiere versterben. Zu einem völligen Schutz der Tiere vor einer Tumorerkrankung kommt es bei einer zusätzlichen mCMV-Infektion (Abb. 11D). Dieser Versuch zeigte, dass eine KM-Rekonstitution bei einem Teil der Tiere in der Lage war, die Tumorerkrankung zu verhindern.

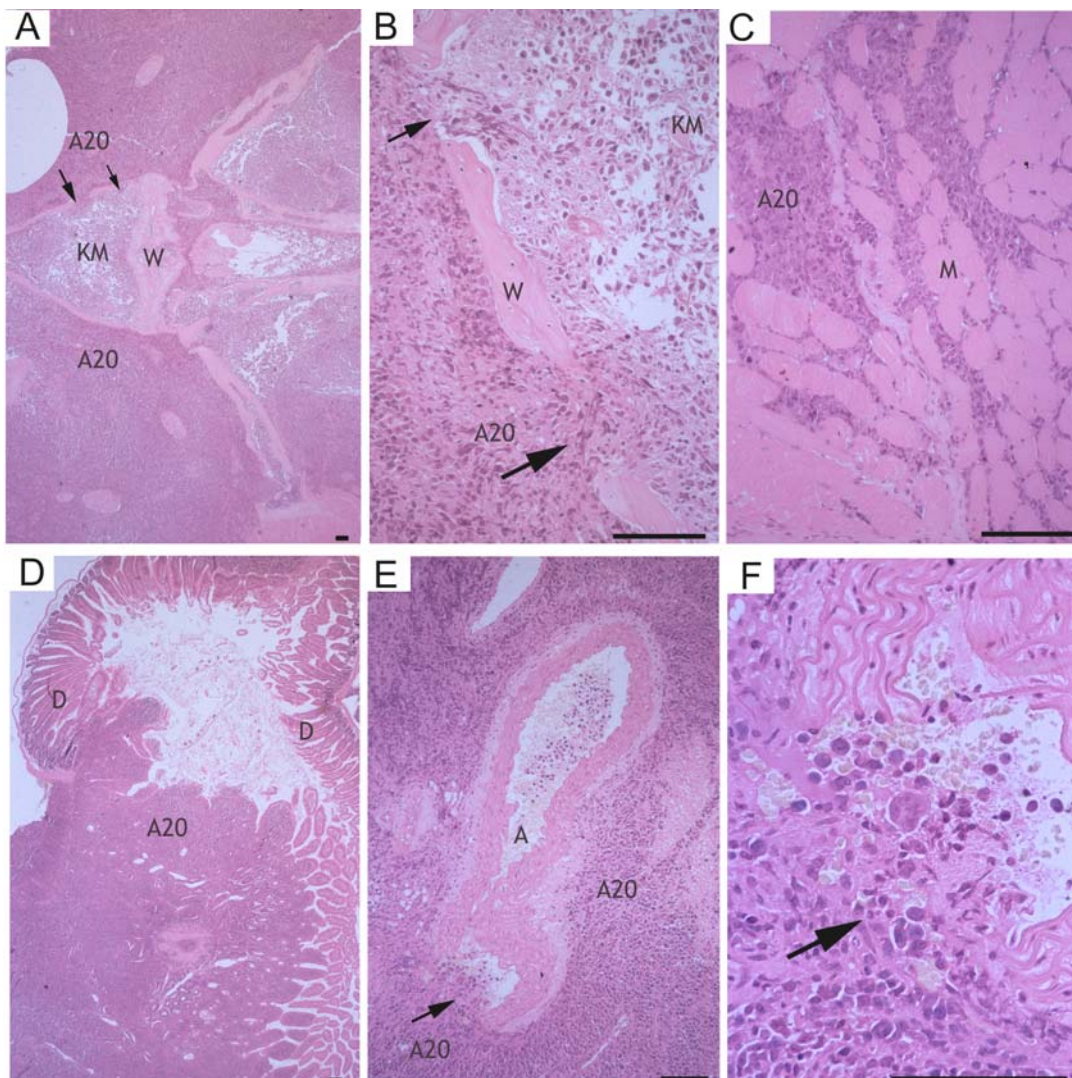
### 3.3 Organtropismus der A20-Zellen

Um den Organtropismus der A20-Zellen zu studieren, wurden zehn 8-9 Wochen alte weibliche BALB/cJ-Mäuse mit 6 Gy bestrahlt und mit 10<sup>6</sup> KMZ rekonstituiert.

Zusätzlich wurden  $10^6$  A20-Zellen i. v. gegeben. Folgende Organe wurden am 18. Tag nach der Behandlung untersucht: das Gehirn, der Darm, die Speicheldrüsen, die Lungen, das Herz, die Milz, die Leber, die Ovarien und das Retroperitoneum mit Nieren, Rückenmark, Wirbelsäule und Muskulatur. Die Gewebe wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt (Abb. 12).

In folgenden Organen konnten keine Tumormetastasen nachgewiesen: im Gehirn, in den Speicheldrüsen, im Herz.

In folgenden Organen konnten wenige Metastasen nachgewiesen werden: in den Lungen, in der Milz, in der Leber, in den Ovarien und im Darm.



**Abbildung 12: Tumoresiedlung verschiedener Organe.**

Histologische Färbung mit Hämatoxylin/Eosin. (A) Querschnitt durch die untere Lendenwirbelsäule mit Rückenmark. Pfeile zeigen einwandernde Tumorzellen ins KM. (B)

Detailaufnahme des Tumors, der ins KM einbricht; es kommt zur Zerstörung des Knochens. (C) Tumorzellen im Bereich der Rückenmuskulatur. (D) Tumorzellen, die in die Darmwand infiltrieren. (E) Einbruch des Tumors in die großen Gefäße. (F) Detailaufnahme von (E). A20 = Tumorzellen, A = Aorta, D = Darmlumen, KM = Knochmark, M = Muskulatur, W = Wirbelkörper. Der Balken entspricht 100µm.

Am massivsten und sehr beeindruckend war die Tumorbesiedelung im Retroperitoneum. Hier waren sämtliche untersuchten Gewebeproben voll mit Tumorzellen. Die Nierenlager waren ausgefüllt mit A20-Zellen. Die Tumorzellen infiltrierten die Rückenmuskulatur, teilweise das Rückenmark durch die Foramina und die Gefäßwände der Aorta und Vena cava inferior. Beispielhaft zeigen die HE-Bilder (Abb.12) den massiven Befund.

### 3.4 Klonierung des Leber-adaptierten A20-Subklons E12E

Die A20-Tumorzelllinie entstammt ursprünglich einer weiblichen BALB/c-Maus. Somit besitzt die Zelllinie kein Y-Chromosom, anhand dessen sie in einer weiblichen Empfängermaus hätte nachgewiesen werden können. Um aber eine Elimination des Tumors oder auch eine minimale Residuale Leukämie (MRL) nachweisen zu können haben wir in die A20-Zellen einen Marker, nämlich das *lacZ*-Gen ( $\beta$ -Galaktosidase) eingeführt.

Dazu wurde zunächst ein Vektor, der das *lacZ*-Gen enthält, kloniert. Die Herstellung des Vektors pcDNA3/*lacZ* mit dem *lacZ*-Gen ( $\beta$ -Galaktosidase) ist im Kapitel 2.2.5.1 dargestellt. Dieser wurde durch Elektroporation in die A20-Zellen transfiziert (Kap. 2.2.5.2).

Die *lacZ*-Expression der A20-*lacZ*-Zellen wurde mittels der X-Gal-Färbung überprüft (Kap. 2.1.5). Dabei zeigte sich, dass die transfizierten A20-Zellen zu 85% *lacZ*-exprimierende Zellen (blaue Zellen) und zu 15% nicht *lacZ*-exprimierende Zellen (keine blauen Zellen) hatten (Kap. 2.2.5.2).

Die A20-*lacZ*-Zellen wurden dann einer *limiting-dilution*-Klonierung unterzogen, um Einzelklone zu erhalten, die möglichst zu 100% das *lacZ*-Gen exprimieren sollten (Kap. 2.2.5.3).

Die *limiting-dilution*-Klonierung führte zu 113 Klonen, welche, jeder Klon für sich, unterschiedlich stark  $\beta$ -Galaktosidase exprimierten. Von allen Klonen zeigten 28% eine stabile  $\beta$ -Gal-Expression, während die restlichen Klone eine Variegität in ihrer

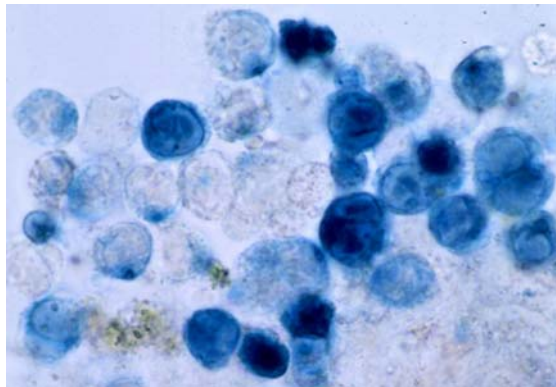
Expression zeigten (Kap. 2.2.5.4). Allerdings waren alle Klone – auch die Nicht-Expressor-Zelllinien – in der *lacZ*-spezifischen PCR positiv.

Im Kapitel Material & Methoden sind alle Arbeitsschritte, die zu den A20/*lacZ*-Klonen führten, detailliert aufgeführt.

Als nächstes erfolgte eine *in vitro* und *in vivo* Untersuchung von vier Klonen, die im folgenden Kapitel beschrieben sind.

### 3.4.1 *In vivo* Untersuchung der A20/*lacZ*-Klone der ersten Generation

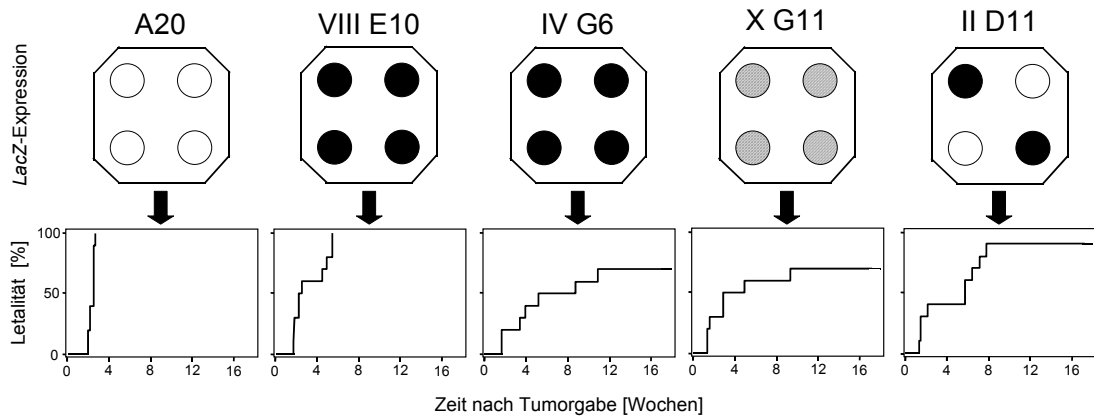
Für *in vivo* Experimente wurden vier Klone näher untersucht. Die Klone IVG6 und VIII E10 exprimierten  $\beta$ -Galaktosidase zu 100%, wobei diese tief dunkelblau nach X-Gal-Färbung waren (*in vitro*-Versuche). Der Klon XG11 exprimierte ebenfalls 100%, jedoch war sein Phänotyp nur schwach blau. Der Klon IID11 zeigte eine *lacZ*-Expression von etwa 50% tief dunkelblaue Zellen und 50% nicht exprimierende Zellen (Abb. 13).



**Abbildung 13: *lacZ*-exprimierende Zellen des Klons IID11 nach X-Gal-Färbung.** Der Klon IID11 exprimiert zu 50% das *lacZ*-Gen (blaue Zellen).

Um die vier ausgewählten A20/*lacZ*-Klone mit der A20-Parentalzelllinie vergleichen zu können, wurden diese im Tierversuch auf ihre Pathogenität überprüft. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit die einzelnen Klone Unterschiede in ihrem Wachstum zeigten oder zu einem unterschiedlichen Verlauf der Sterbekurve der Tiere führten. Dazu wurden 8 bis 9 Wochen alte Mäuse des BALB/cJ-Stamms mit 6 Gy immunsupprimiert und bekamen  $10^6$  Tumorzellen intravenös injiziert. Die Tiere

wurden dann über einen Zeitraum von 20 Wochen täglich kontrolliert und gestorbene Tiere registriert (Abb. 14).



**Abbildung 14: Pathogenität der *lacZ*-Subklone *in vivo*.**

Die Würfelpiktogramme zeigen die Intensität der β-Gal-Expression (weiß = keine Expression; schwarz = starke Expression; schraffiert = schwache Expression) und die prozentuale Verteilung der blauen Zellen in Kultur.

Die Tiere wurden immunsupprimiert (6 Gy) und bekamen  $10^6$  Tumorzellen injiziert (N = 10 Tiere/Gruppe).

Es zeigte sich, dass der Klon VIII E10 innerhalb von 6 Wochen zum Tod aller Tiere führte, während der Klon IV G6, der *in vitro* die gleiche β-Gal-Expression zeigte, nur in 70% der Tiere letal wirkte. Obwohl beide Klone gleich stark β-Gal exprimierten, waren sie für die Tiere unterschiedlich pathogen. Der schwach exprimierende Klon X G11 war ebenfalls für 70% der Tiere letal und der Verlauf der „Sterbekurve“ war dem des Klons IV G11 ähnlich. Der Klon II D11 war für die Tiere stärker pathogen.

Der Attenuierungsgrad der Klone korrelierte nicht mit der Reporterexpression *in vitro*. So zeigten die tief dunkelblau β-Gal-exprimierenden Klone VIII E10 und IV G6 einmal eine schwache und einmal eine starke Attenuierung. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem stark-exprimierenden Klon IV G6 und dem schwach-exprimierenden Klon X G11 detektiert werden.

### 3.4.2 Generierung der A20/*lacZ*-Klone zweiter Generation

Um die β-Gal-Expression der Klone VIII E10, IV G6, X G11 und II D11 *in vivo* und nach Reisolierung zu analysieren, wurden Mäuse mit 6 Gy bestrahlt und bekamen  $10^6$  Tumorzellen der oben genannten Klone i. v. injiziert. Präfinal wurden einzelne Tiere

seziert (Tag 24-48) und aus tumorhaltigen Leberstücken Tumorzellen isoliert und vermehrt.

Die Rekultivierung der Tumorzellen (*ex tumore*) aus Lebergewebe zeigte, dass die Anzahl der  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden Zellen deutlich zurückgegangen war. Lediglich im Klon IID11 exprimierten 20% der Zellen das Reportergen. Die anderen Klone zeigten eine Expression von maximal 1%. Nach neun Zellpassagen wurden diese rekultivierten Tumorzellen (Klon IID11) aus der Leber einer *limiting dilution*-Klonierung unterzogen um Einzelklon-Zelllinien zu erhalten, die möglicherweise zu 100%  $\beta$ -Galaktosidase exprimierten. In den insgesamt 960 Wells konnten 58 Klone (siehe Anhang III, Kap. 6) mit wiederum verschiedenen Expressionsstärken kultiviert werden.

Die Klonbezeichnungen wurden folgendermaßen erstellt: Ein Klon, der z. B. auf der 96-Lochplatte E in der Spalte 2 und der Reihe B gewachsen war, hieß demzufolge E2B (Platte E, 2. Reihe, Spalte B).

Im Anhang IV (Kap. 6) befinden sich die Ergebnisse zur  $\beta$ -Gal-Expression dieser Klone. In einem Zeitraum von 6 Wochen wurden drei X-Gal-Färbungen im Abstand von 2 Wochen durchgeführt. Hierfür wurde der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, die sich blau färbten, also das Reportergen exprimierten. Grau gekennzeichnete Klone wurden nicht untersucht.

Für weitere Analysen wurden drei „*ex tumore*“-Klone ausgewählt. Der Klon E2B, der keine Blaufärbung zeigte, und die Klone H11H und E12E, die zu 80% in der X-Gal-Färbung positiv waren. Es stand uns kein Klon zur Verfügung, der zu 100% blaue Zellen nach X-Gal-Färbung zeigte.

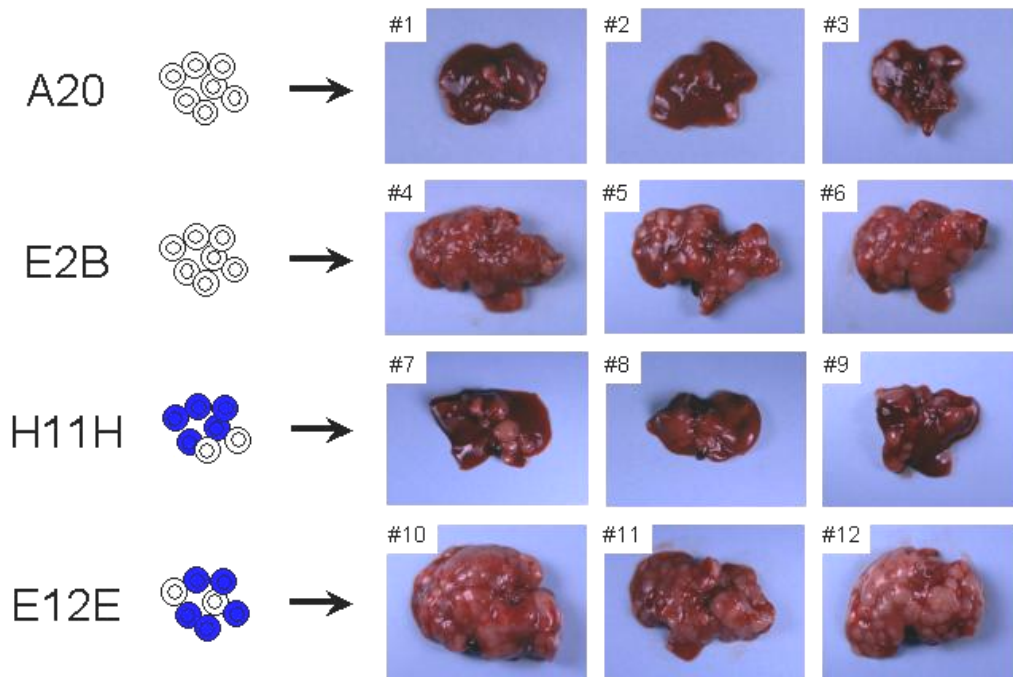
Tab. 5: *LacZ*-Expression der *ex tumore*-Klone

Klonbezeichnung	<i>LacZ</i> -Expression nach X-Gal-Färbung ( <i>in vitro</i> )
H11H	80%
E12E	80%
E2B	keine

Die 3 Klone (H11H, E12E und E2B) wurden dann im Tierversuch auf ihre Tumorigenität beurteilt. Die Tumorzellen ( $10^6$  Zellen/Tier) wurden 6 Gy bestrahlten Rezipienten appliziert. Bei der Sektion der Tiere fiel auf, dass sich die Tumorzellen aller Klone vor allem in der Leber abgesiedelt hatten.

Zum Zeitpunkt der Sektion (nach 5 Wochen) wurden die Lebern der Tiere fotografiert (Abb. 13). Im Vergleich der Lebern fiel auf, dass die Lebern der Tiere, die mit den Tumorzellen des Klons H11H oder der Parentalzelllinie A20 inokuliert wurden,

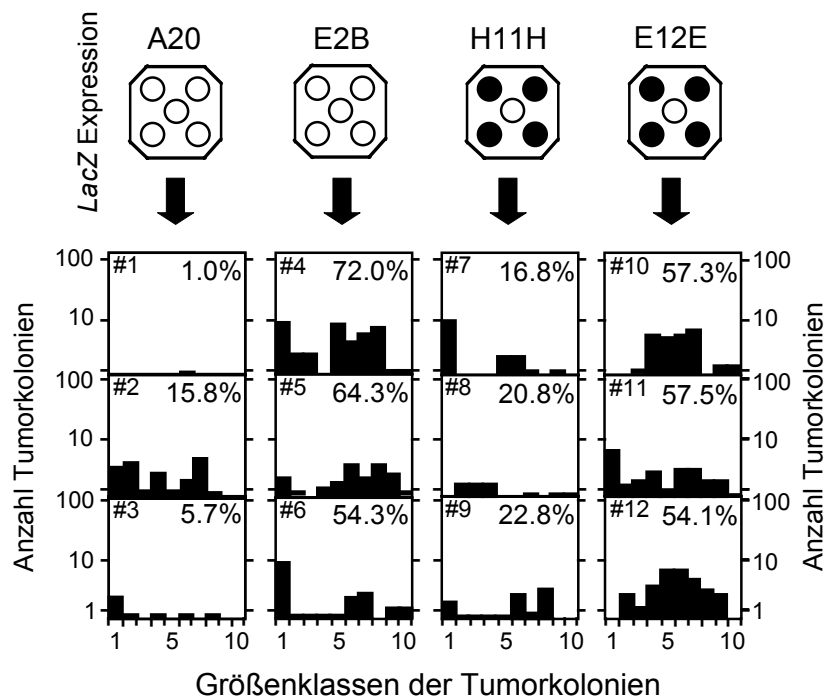
deutlich weniger Tumorherde aufwiesen, als die Tiere, die Tumorzellen der Klone E12E oder E2B erhalten hatten. Die Tumorigenität der Klone korrelierte somit wiederum nicht mit der Expression des Reportergens. Die Ergebnisse sind in den zwei Abbildungen 15 und 16 dargestellt.



**Abbildung 15: Gesteigerte Tumorigenität nach der *in vivo* Passage.**

Tumorigenität der *ex tumore* klonierten Klone im Vergleich zur A20-Zelle. Zellen zeigen die  $\beta$ -Gal-Expression *in vitro*. Die Lebern wurden den Tieren nach 5 Wochen entnommen und fotografiert.

Auch bei dieser Klonierung kam es zu einem *Silencing* der Reportergenexpression. Es konnten in Kryostatschnitten aller 12 Lebern nach X-Gal-Färbung nur maximal 5% positive Tumorzellen nachgewiesen werden. Überwiegend jedoch waren < 1% der Zellen positiv. Auch *ex tumore* kultivierte Tumorzellen zeigten dieses Phänomen. Dieses *Silencing* war unabhängig vom Zellzyklus der Zellen und auch unabhängig davon, ob die Zellen unter Selektionsdruck (G418) standen oder nicht.



**Abbildung 16: Tumorigenität der *ex tumore* reisolierten Sublinien des Klons IID11 im Vergleich mit der Parentalzelle A20.**

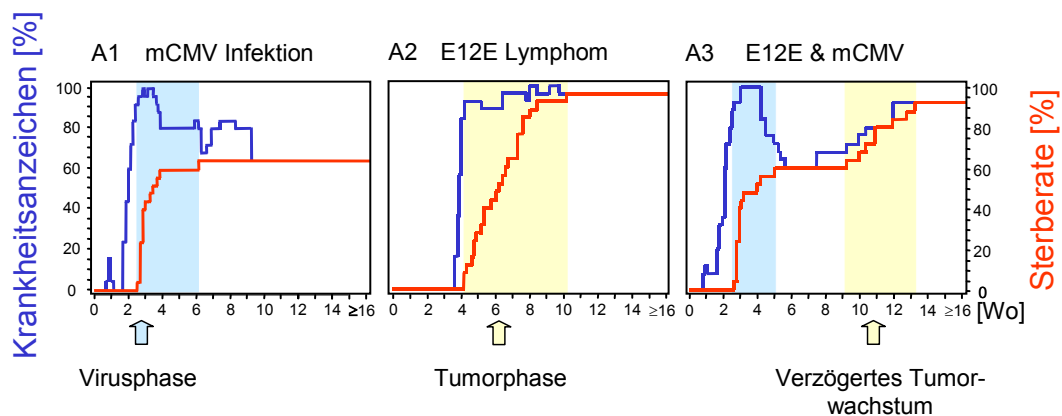
Die Würfelplattogramme zeigen die prozentuale Verteilung der blauen Zellen in Kultur. Die Anzahl und die Größe der Tumorkolonien in der Leber wurden mittels einer für das B-Zell-Antigen B220 spezifischen IHC ermittelt. Die Rezipiententiere wurden durchnummeriert (#1-12) und entsprechen der Nummerierung in Abb. 15. Der prozentuale Anteil Tumorgewebe ist in der rechten oberen Ecke gezeigt.

Bei dieser Untersuchung fiel der Hepatotropismus der *ex tumore* reklonierten Klone E2B und E12E auf. Während sich die A20-Parentalzellen in verschiedenen Organen, insbesondere aber retroperitoneal ansiedelten, fand man die Kolonien der A20/*lacZ*-Klone vor allem in der Leber, nur vereinzelt in der Milz und selten in den Ovarien, jedoch nie im Retroperitoneum (oder in anderen Organen, siehe Kap. 3.3).

Für alle weiteren Untersuchungen wurde aufgrund der höchsten Tumorigenität und  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsrate die Transfektante E12E ausgewählt.

### 3.5 Der antitumorale Effekt von mCMV unter KM-Rekonstitution und Gabe antiviraler Killerzellen

Am Tag vor der KMT wurden die Rezipienten einer hämatoablativen Behandlung durch  $\gamma$ -Bestrahlung (7 Gy) unterzogen. In den Rezipienten kommt es bei einer KMT mit einer suboptimalen Zahl an KMZ ( $10^6$  Zellen/Tier) zu einer schlechten Rekonstitution der Tiere. Infizierte man diese Tiere zusätzlich mit mCMV ( $10^5$  pfu mCMV, i. pl.), so führte dies zu einer hohen Letalität (Abb. 17, Teilbild A1). Diese Tiere zeigten die typischen Symptome einer CMV-Erkrankung, die sich zwischen der zweiten und vierten Woche in einer multiplen Organmanifestation äußerte.



**Abbildung 17: Sterbekurven von Tieren, die eine suboptimale Zahl an KMZ zur Rekonstitution erhielten.**

Die weiblichen, 8 bis 9 Wochen alten BALB/cJ-Tiere (N = 25/Gruppe) wurden am Tag vor der KMT mit 7 Gy bestrahlt. Am Tag der Transplantation erhielten sie  $10^6$  KMZ und  $10^6$  E12E-Zellen. Die Infektion erfolgte mit  $10^5$  pfu mCMV (i. pl.).

Bei Tieren, die nur infiziert wurden (Abb. 17, Teilbild A1), kam es zu einer deutlich früher beginnenden Sterbephase als bei nicht infizierten Tieren (Abb. 17, Teilbild A2). Das Sterben der Tiere zwischen der 2. und 4. Woche ist durch die CMV-Erkrankung zu erklären. Diese Tiere, welche nur die E12E-Zellen injiziert bekamen, verstarben fast alle innerhalb der 4. und 10. Woche am massiven Wachstum des Tumors (Abb. 17, Teilbild A2).

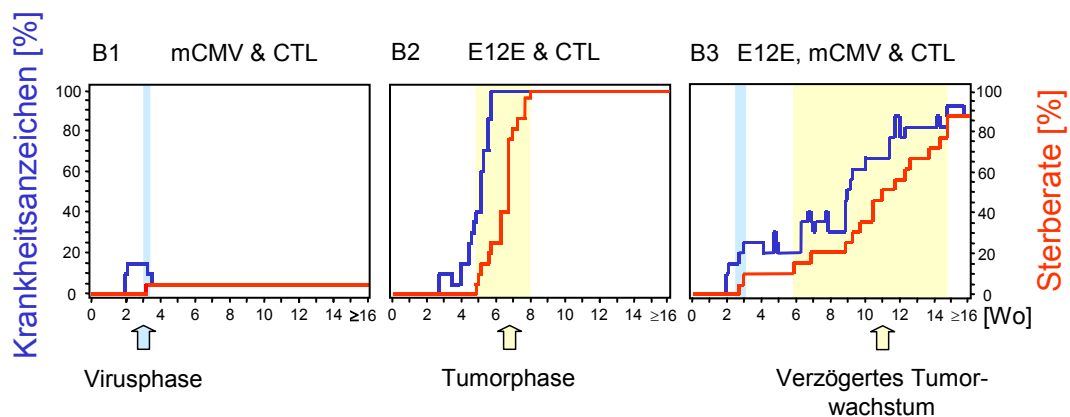
Bei Tieren, die zusätzlich zur Tumorgabe infiziert wurden (Abb. 17, Teilbild A3), kam es zwischen der 2. und 4. Woche ebenfalls zu einer erhöhten Virus-bedingten Sterberate. Die Sterbephase mündete ab der 5. Woche in eine Plateauphase, die etwa 5 Wochen andauerte. Ab der 9. Woche kam es dann wieder zu einer „Sterbephase“ der Tiere. Tiere, die in dieser zweiten Phase verstarben, wurden

seziert. Dabei zeigte sich, dass das Sterben durch ein massives Tumorwachstum bedingt war.

Bemerkenswert ist nun, dass es durch die mCMV-Infektion zu einer zeitlichen Verzögerung des Tumorwachstums um ca. 4 bis 5 Wochen kam (Vergleich von A2 und A3).

In einem weiteren Versuch (Abb. 18) wurden die Tiere einer präemptiven antiviralen Therapie unterzogen. Diese Tiere erhielten zusätzlich zytotoxische Lymphozyten (CTL), die spezifisch für ein mCMV-Peptid (Sequenz  $^{168}\text{YPHFMPNTL}^{176}$ ) aus dem IE1-Protein waren (Reddehase et al., 1989). Dazu wurden die Rezipienten am Tag vor der KMT mit 7 Gy bestrahlt. Am Tag der Transplantation erhielten die Rezipienten vormittags  $2 \times 10^6$  KMZ zusammen mit  $10^6$  E12E-Zellen. Am Nachmittag wurden dann  $10^6$  IE1-CTL injiziert. Die zeitliche Trennung der Knochenmark-/Lymphomzellen-Gabe von der IE1-CTL-Gabe wurde vorgenommen, um die Tiere nicht mit einem zu großen Injektionsvolumen zu belasten.

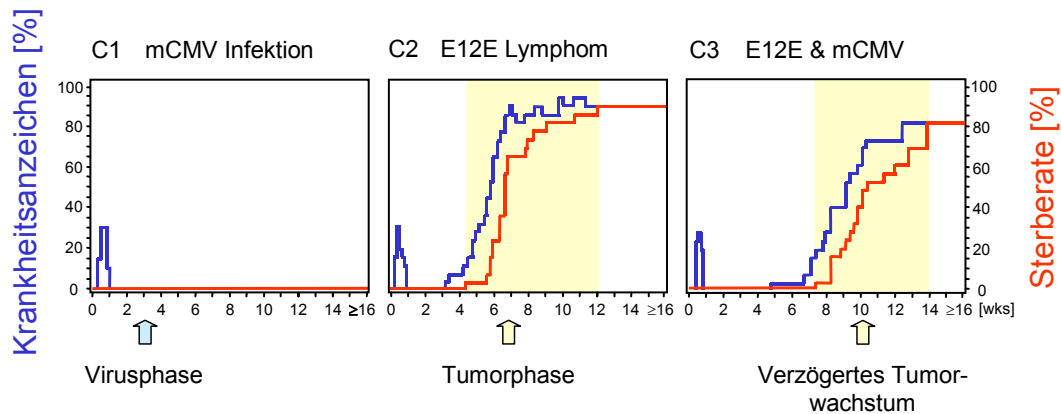
Die Ergebnisse zeigen, dass die Gabe von IE1-spezifischen CTL die mCMV-Infektion nahezu verhindert (Teilbild B1). Erwartungsgemäß wurde das Wachstum des E12E-Lymphoms nicht beeinflusst (Teilbild B2), da die CTL nicht gegen die Tumorzellen gerichtet sind. Auch hier kam es nach Infektion zu einer Verzögerung der Tumorentstehung (Vergleich von B2 und B3). Die frühe, Virus-bedingte Letalität blieb jedoch aus. Die CTL konnten zwar die schwere Symptomatik der mCMV-Infektion verhindern, nicht aber den antitumoralen Effekt durch mCMV.



**Abbildung 18: Sterbekurven von Tieren, die einen adoptiven Transfer erhielten.**

Die weiblichen, 8 bis 9 Wochen alten BALB/cJ-Tiere (N = 20/Gruppe) wurden am Tag vor der KMT mit 7 Gy bestrahlt. Am Tag der Transplantation erhielten sie  $2 \times 10^6$  KMZ,  $10^6$  E12E-Zellen (vormittags) und  $10^6$  IE1-CTL (nachmittags). Die Infektion erfolgte mit  $10^5$  pfu mCMV (i. pl.).

Im nächsten Versuch wurden die Tiere mit einer sehr hohen Dosis an Knochenmark rekonstituiert. Die Rezipienten wurden am Tag vor der Transplantation mit 7 Gy bestrahlt und erhielten das KM ( $10^7$  KMZ/Tier) zusammen mit den Tumorzellen ( $10^6$  E12E-Zellen/Tier). Eine Infektion erfolgte mit  $10^5$  pfu mCMV (i. pl.).



**Abbildung 19: Sterbekurven von Tieren, die mit  $10^7$  KMZ rekonstituiert wurden.**

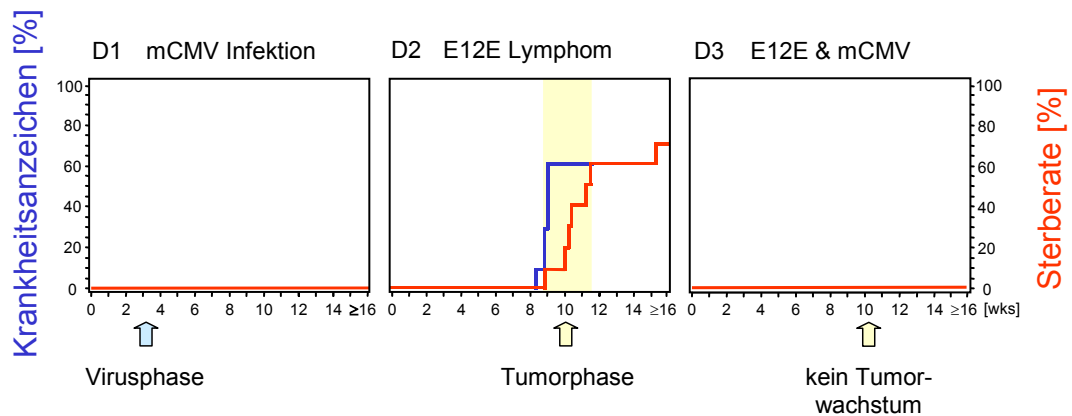
Die weiblichen, 8 bis 9 Wochen alten BALB/cJ-Tiere (N = 25/Gruppe) wurden am Tag vor der KMT mit 7 Gy bestrahlt. Am Tag der Transplantation erhielten sie  $10^7$  KMZ und  $10^6$  E12E-Zellen. Die Infektion erfolgte mit  $10^5$  pfu mCMV (i. pl.).

Durch die Gabe dieser sehr hohen Zahl an KMZ ( $10^7$ /Tier) kam es in den infizierten Tieren zu keiner mCMV-Erkrankung (Abb. 19, Teilbild C1). Dieser Schutz beruht auf der antiviralen Aktivität der CD8-Zellen, unabhängig davon, ob diese Zellen dem Donor-KM oder einem zusätzlichen adoptiven Transfer entstammen.

Die Gabe von  $10^7$  KMZ beeinflusst dagegen das Tumorwachstum nur geringfügig. Der Beginn des Versterbens der Tiere tritt etwa eine Woche später auf (im Vergleich zu Abb. 17, A2) und es gibt in dieser Gruppe, etwas mehr Tiere, die überleben (Langzeit-Überlebende). Auch hier findet man eine zeitliche Verzögerung der Tumorbedingten Letalität zwischen infizierter und nicht infizierter Gruppe von ca. 4 bis 5 Wochen.

Somit führte eine 10-fache Steigerung der Anzahl transplantierte KMZ dazu, dass das Tumorwachstum etwas später einsetzte. Es wurde jedoch nicht vollständig verhindert.

Besonders beeindruckend ist der antitumorale Effekt von mCMV in immunkompetenten Tieren. Diese Tiere wurden nicht hämatoablativ behandelt. Jedes Tier erhielt  $10^6$  E12E-Zellen. Die Infektion erfolgte mit  $10^5$  pfu mCMV.



**Abbildung 20: Sterbekurven von immunkompetenten Tieren.**

Die Teilbilder zeigen den Anteil der kranken und verstorbenen Tiere (N = 10/Gruppe).

Es ist bekannt und wurde hier bestätigt, dass es in „gesunden“ Mäusen zu keiner CMV-Erkrankung kommt (Abb. 20, Teilbild D1). Es zeigte sich, dass die Tumorgabe für 70% dieser Tiere letal war (Teilbild D2). Mäuse, die mit dem Lymphom inokuliert und mit mCMV infiziert wurden, entwickelten dagegen im gesamten Beobachtungszeitraum von 52 Wochen keinen Tumor (Teilbild D3).

Resümee:

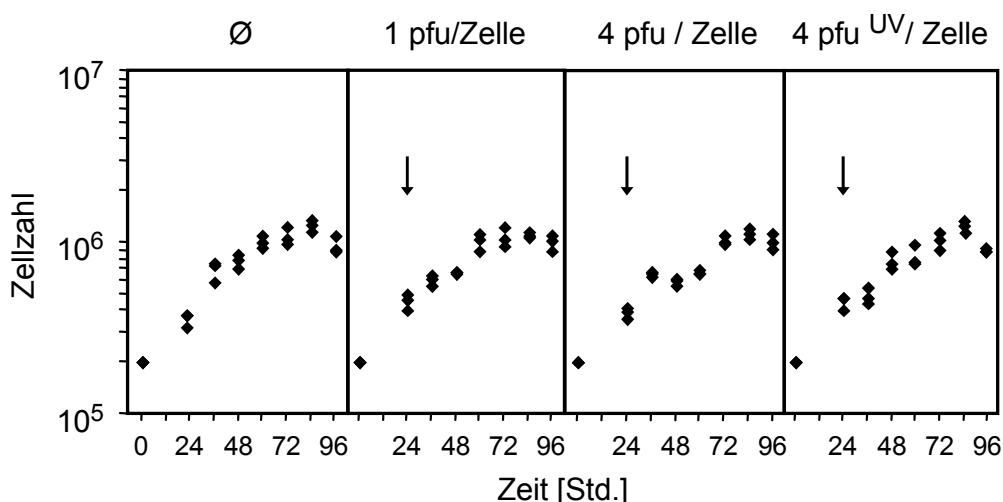
Der antileukämische Effekt von mCMV führte zu einer Verzögerung der Tumorerkrankung in rekonstituierten Rezipienten. In immunkompetenten Mäusen war der Schutz vor dem Tumor vollständig.

Der antileukämische Effekt von mCMV beruht nicht auf einer symptomatischen mCMV-Erkrankung. Eine kurzfristige Anwesenheit des Virus scheint ausreichend zu sein, zumindest temporär antitumoral zu wirken.

### 3.6 Einfluss von mCMV auf das Wachstum der E12E-Zellen *in vitro*

Um zu untersuchen, ob E12E-Zellen infizierbar sind, wurden zum einen Zellkulturversuche (*in vitro*) durchgeführt und zum anderen erfolgte der *in vivo* Nachweis immunhistologisch in Lebern von infizierten Tieren.

Für den *in vitro* Nachweis wurden Wachstumskurven mit und ohne Zugabe von mCMV aufgenommen. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen mCMV inkubiert. Dabei entspricht 1 pfu mCMV etwa 500 viralen Genomen (150 Monokapsidvirionen und 100 Multi-Kapsid-Virionen) (Kurz et al., 1997). In einem zusätzlichen Ansatz wurde das Virus mit UV-Licht inaktiviert, um einen möglichen Einfluss von Virusoberflächenstrukturen (z. B. Glykoproteine) zu untersuchen (siehe Abb. 21).



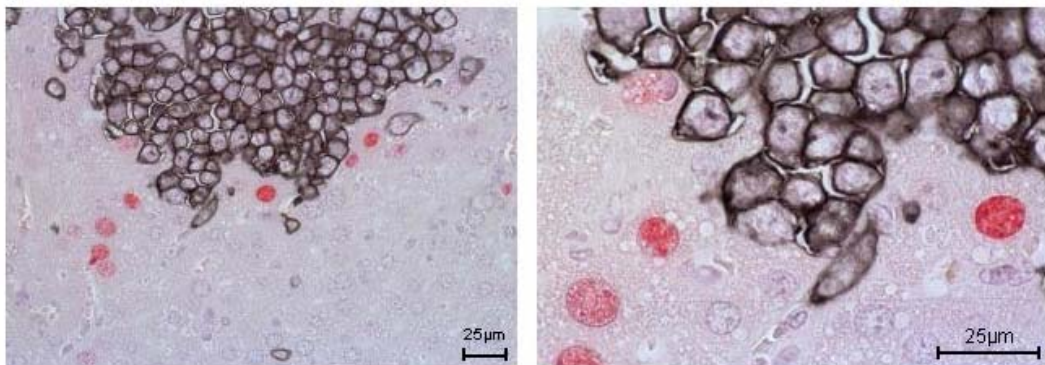
**Abbildung 21: Zellwachstumskurven von E12E *in vitro*.**

E12E-Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Nach 24 Stunden wurde erstmals die Zahl der Zellen bestimmt. Die folgenden Zellzählungen wurden in 12-Stunden-Intervallen durchgeführt. (Ø) Wachstumskurve in Abwesenheit von mCMV. Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Infektion.

Die *in vitro* Experimente zeigten, dass die Zugabe von mCMV keinen Einfluss auf das Wachstum der E12E-Zellen hatte. Es kam zu keinem direkten oder indirekten zytopathischen Effekt, der die Proliferation der E12E-Zellen beeinflusste. Passend zu diesem Versuch konnte in Immunfluoreszenzversuchen kein IE1-Protein (pp89) im Zellkern von E12E-Zellen nachgewiesen werden (Nachweis von IE1 mit anti-IE1-

Antikörpern (Croma101) und einem Fluorescein-markierten anti-Maus-IgG-Antikörper (Sigma, # A 7827) nach 2, 6, 12 und 24 Stunden Inkubation).

Der *in vivo* Nachweis erfolgte in Tieren, die mit Tumor und Virus inokuliert wurden. Die Lebern dieser Tiere wurden mit einer immunhistologischen Doppelfärbung untersucht. mCMV wurde mittels des IE1-Proteins und die Tumorzellen wurden anhand der B-Zell-Expression des B-Zell-Antigens CD45R/B220 nachgewiesen. Die IE1-Färbung ist eine Kernfärbung, die in der hier gewählten Kombination rot erscheint. Die CD45R/B220 erscheint als eine Membranfärbung in schwarz (Abb. 22).



**Abbildung 22: Immunhistologische Analyse einer möglichen Wechselbeziehung zwischen Lymphom und mCMV.**

IHC-Doppelfärbung CD45R/B220 (schwarz) und IE1-Protein (rot). Lebergewebe (Tag 21) aus der Maus #35 (Abb. 25).

In keiner der untersuchten Lebern konnte eine Tumorzelle nachgewiesen werden, die eine Doppelfärbung zeigt. Somit ist eine Infektion der Tumorzellen (Onkolyse) sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auszuschließen.

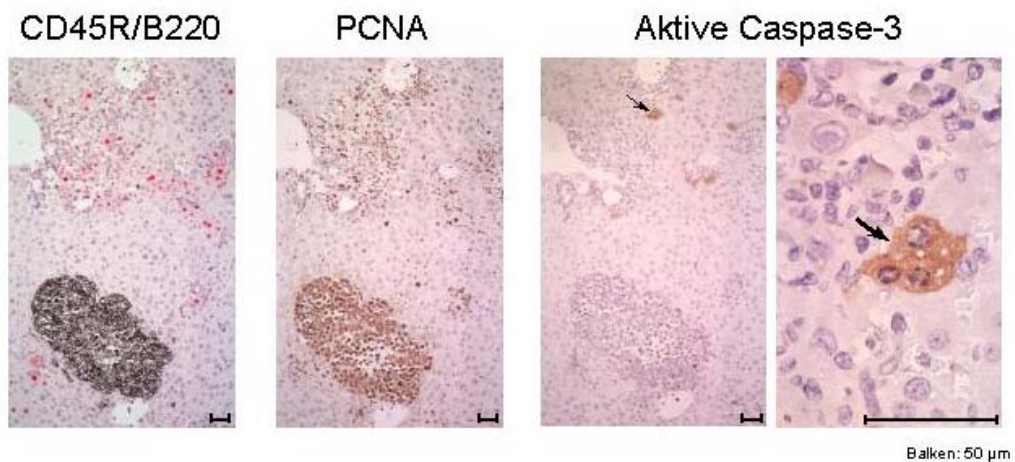
Resümee:

Der Mechanismus des antitumoralen mCMV-Effektes beruht nicht auf Onkolyse.

### **3.7 Analyse von Apoptose und Proliferation der E12E-Zellen *in vivo***

Ein möglicher Mechanismus für den antitumoralen Effekt von mCMV könnte die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen sein. Eine weitere Überlegung ist, dass mCMV in den Tumorzellen eine Zellarretierung (Zytostase) verursachen könnte, die

letztlich ein verringertes Tumorwachstum in den infizierten Tieren zur Folge hätte. Beide Punkte konnten bereits im Kapitel 3.6 durch Analyse von Zellwachstumskurven *in vitro* widerlegt werden. Eine *in situ* Analyse stand noch aus. Hierfür wurden Serienschritte von Lebern KM-transplantierte Tiere, welche Tumor und mCMV erhalten hatten, angefertigt (Abb. 23). Eine mögliche Apoptose wurde mit einer immunhistologischen Färbung spezifisch für aktive Caspase-3 und Zellproliferation mittels des PCNA- (*proliferating cell nuclear antigen*-) Marker nachgewiesen. Die zeitliche Besonderheit der PCNA-Expression in der Zelle macht es zu einem idealen Marker für die Zellproliferation. PCNA wird nämlich während der Phase G1 des Zellzyklus verstärkt exprimiert und ist während der S Phase reichlich vorhanden, erst in der G2/M Phase nimmt die Expression ab (Kurki et al., 1988; Hall et al., 1990).



**Abbildung 23: Immunhistologische Analyse von Proliferation und Apoptose der Lymphomzellen.**

Alle IHC-Färbungen wurden in der Leber der Maus #35 (Abb. 25) durchgeführt. Doppelfärbung IE1-Protein (rot) und CD45R/B220 (schwarz). IHC PCNA braun. Aktive Caspase-3 braun. Pfeil zeigt eine Gruppe von apoptotischen Zellen, die jedoch weit von den Tumorkolonien entfernt liegen.

Im Tumor sind alle Zellen PCNA positiv, auch die Tumorzellen, die infizierten Hepatozyten räumlich sehr nahe liegen. Es konnten keine nicht proliferierenden Tumorzellen nachgewiesen werden. Außerdem waren alle Tumorzellen „aktive Caspase 3“-negativ und somit nicht apoptotisch.

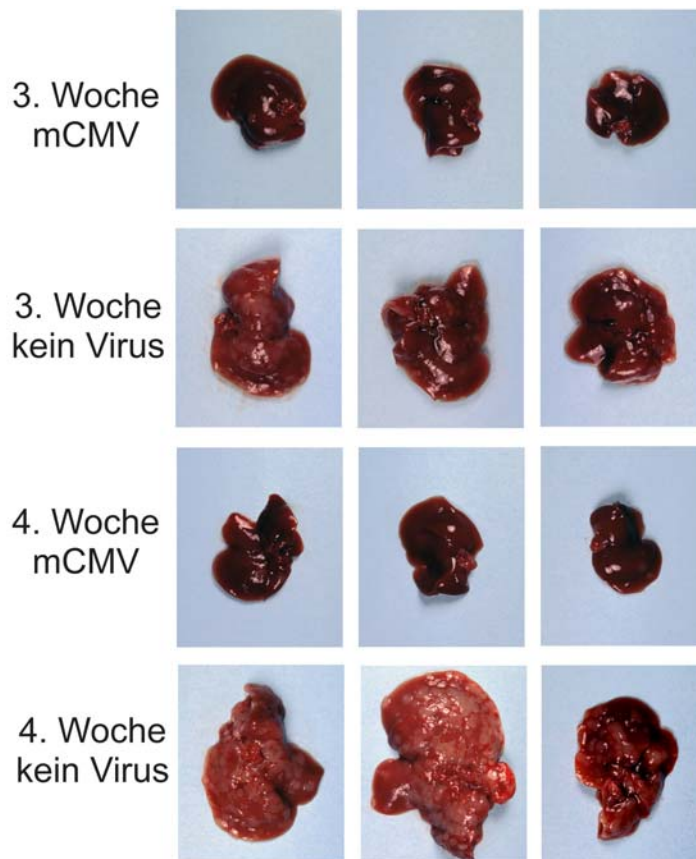
Der antitumorale Effekt von mCMV beruht also weder auf Apoptose noch auf Zytostase.

### 3.8 Quantitative Analyse des *in vivo* Wachstums des E12E-Lymphoms

In diesem Versuch sollte mit histo-morphometrischen Methoden (siehe Kap. 2.2.13) versucht werden, die Lymphombesiedelung der Leber zu verschiedenen Zeitpunkten bei infizierten und nicht infizierten Tieren zu messen.

Hierzu wurden die Rezipienten am Tag vor der KMT mit 7 Gy bestrahlt. Die KMT wurde mit einer suboptimalen Zahl an KMZ durchgeführt ( $10^6$ /Tier) und die Tiere optional mit mCMV infiziert ( $10^5$ pfu/Tier i. pl.).

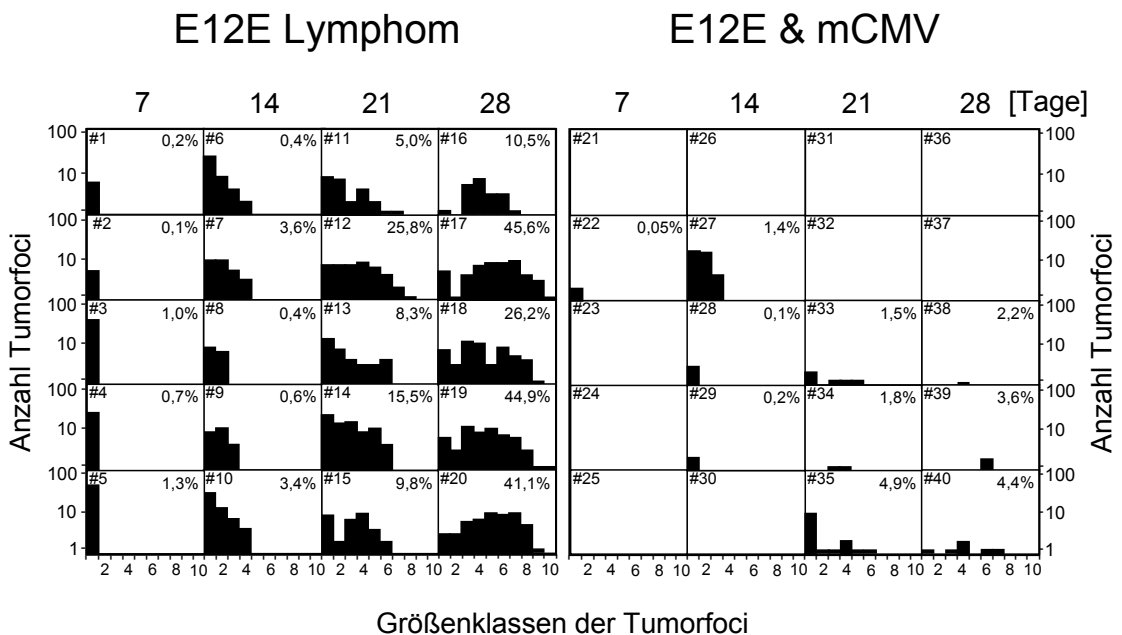
Zu den Zeitpunkten Tag 7, 14, 21 und 28 wurden dann pro Tiergruppe (+/- mCMV) jeweils 5 Tiere seziiert. Von den Lebern der Tiere wurden makroskopische Aufnahmen gemacht (Abb. 24). Außerdem wurden die Lebern immunhistologisch untersucht, um das B-Zell-Lymphom E12E mittels des B-Zell-Markers CD45R/B220 nachzuweisen (Abb. 26).



**Abbildung 24: Lebermakroskopien nach Tumorgabe und +/-Infektion.**

Erste und zweite Reihe: Lebern von Tieren 21 Tage nach Tumorgabe. Dritte und vierte Reihe: Lebern von Tieren 28 Tage nach Tumorgabe. Die Lebern der Tiere nach 7 und 14 Tagen waren in beiden Gruppen unauffällig und sind daher hier nicht gezeigt.

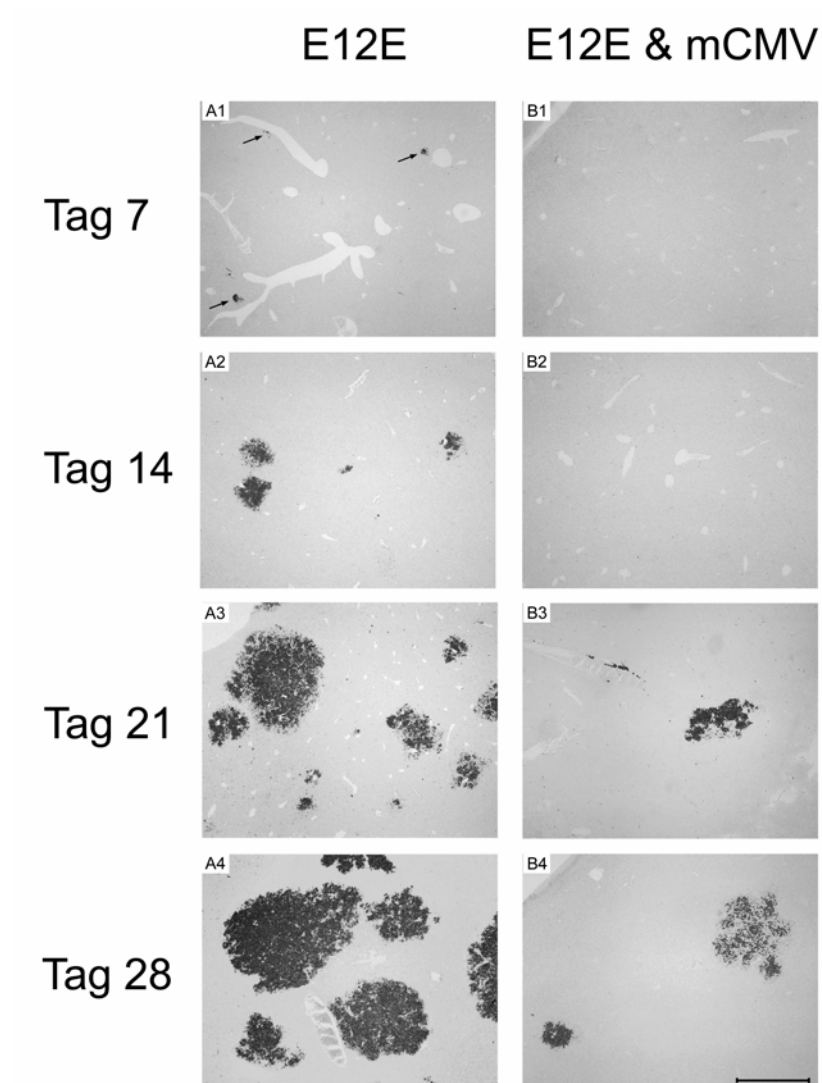
Die makroskopischen Leberaufnahmen zeigen in beeindruckender Weise den Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren. – Die infizierten Tiere zeigen nur eine geringe Tumorlast, während die Lebern der nicht infizierten Tiere stark vergrößert sind (Hepatomegalie) und viele Tumorfoci aufweisen.



**Abbildung 25: Quantitative Analyse des E12E-Wachstums in der Leber.**  
 Zu den gezeigten Zeitpunkten wurde die Anzahl der Tumorkolonien mittels Immunhistochemie CD45R/B220 und Histomorphometrie bestimmt. Pro Leber wurden 100 mm<sup>2</sup> ausgewertet. Die Rezipienten wurden durchnummeriert (#1-40). Die Prozentzahl in der rechten oberen Ecke gibt den relativen Anteil an Tumorgewebe in der Leber an.

In den nicht infizierten Rezipienten (#1-20) kommt es bereits nach 7 Tagen zu kleinsten Tumorkolonien (<0,05 mm<sup>2</sup>), die im Verlauf der nächsten drei Wochen deutlich an Größe zunahmten. Im Gegensatz dazu fand man in der infizierten Tiergruppe am 7. Tag nur in einem von fünf Tieren Tumorkolonien. Auch zu den folgenden Zeitpunkten waren deutlich weniger Tumorkolonien als in den nicht infizierten Tieren vorhanden.

Auch bereits ohne histomorphometrische Analyse zeigten histologische Aufnahmen der Leber in beeindruckender Weise den antitumoralen Effekt von mCMV. Auch hier wurde bereits zum Zeitpunkt Tag 7 der Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren in der CD45R/B220-Immunhistologie deutlich (Abb. 26).



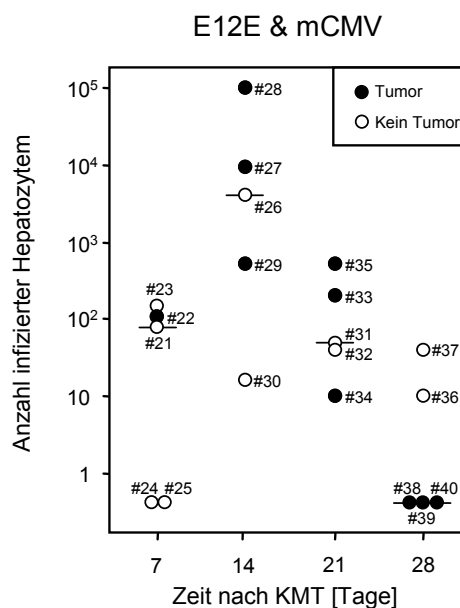
**Abbildung 26: Wachstumskinetik von E12E in der Leber an repräsentativen Schnitten.** (A1-A4) Nicht infizierte Tiere. (B1-B4) Infizierte Tiere. Tumorkolonien wurden durch eine IHC CD45R/B220 angefärbt. Pfeile zeigen die perivaskuläre Ansiedelung der Tumorzellen (A1). Gegenfärbung mit Hämalun.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mCMV zu einer deutlichen Wachstumsverzögerung von E12E in der Leber führt und dass dieser antitumorale Effekt bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt (Tag 7) deutlich wird.

### 3.9 Untersuchung einer möglichen Antikorrelation zwischen Tumorwachstum und der Anzahl infizierter Hepatozyten

Grundsätzlich wäre es möglich, dass eine hohe Virusreplikation in den Tieren zu einem Tumorrückgang führen könnte oder die Ansiedelung verhindern würde. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die Zahl infizierter Hepatozyten mit der Anwesenheit von Tumor in der Leber korreliert. In dem gezeigten Versuch kam es in der infizierten Tiergruppe bei der Hälfte der Tiere zum Tumorwachstum in der Leber.

Ein hoher Grad an Leberinfektion könnte nun theoretisch das Tumorwachstum verhindern, während ein niedriger Grad das Tumorwachstum fördern könnte.



**Abbildung 27: Korrelationsanalyse zwischen dem Grad der Infektion und dem Tumorwachstum in der Leber.**

Der Grad der Leberinfektion wurde mittels IHC für das IE1-Protein bestimmt. Analysiert wurden 100mm<sup>2</sup> Fläche von Schnitten der Leber. Die Nummern entsprechen den Tieren aus dem Versuch Abb. 25.

Die Infektion der Leber erreichte zum Zeitpunkt Tag 14 ihr Maximum mit einer hohen Varianz (20 bis 10<sup>5</sup> infizierte Zellen/100mm<sup>2</sup>). Es gab Tiere (z. B. # 28) in denen trotz starker Infektion, Tumor nachweisbar war. Andererseits auch Tiere (z. B. # 30), die bei geringer Infektion Tumor-frei waren.

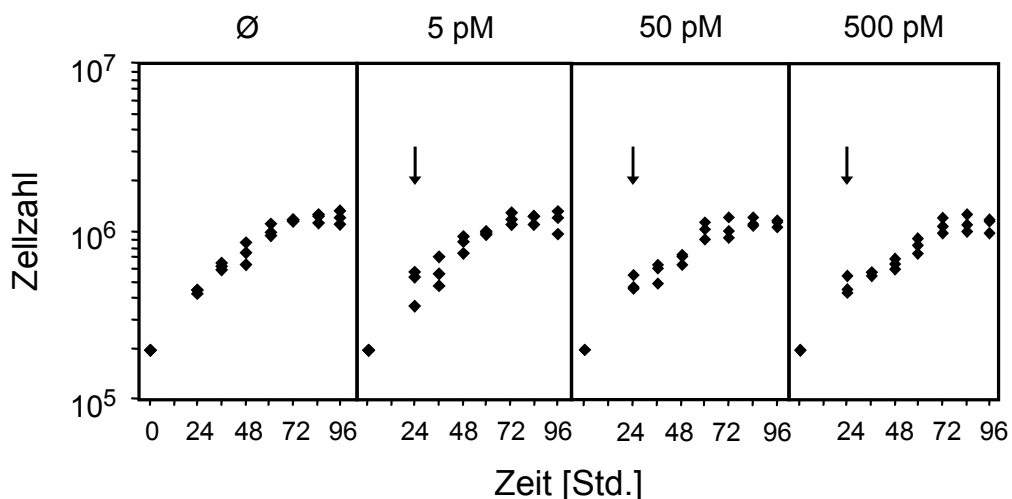
Resümee:

Es besteht keine Korrelation zwischen dem Grad der Infektion und der Anwesenheit von Tumor in der Leber.

### 3.10 Das Wachstum der E12E-Lymphomzellen ist durch Tumor Nekrose Faktor- (TNF-) alpha nicht beeinflussbar

Viele Tumorzellen sind für den zytotoxischen Effekt von TNF-alpha empfänglich (Jäätela et al., 1991). Es sollte untersucht werden, ob vielleicht die Sezernierung von TNF-alpha Grundlage des antitumoralen mCMV-Effektes ist. TNF-alpha könnte durch Makrophagen oder dendritische Zellen die sich am Infektionsort befinden, produziert wurden.

Zur Klärung dieser Fragestellung, wurden zwei Versuche durchgeführt: Zum einen ein *in vitro* Experiment, bei welchem E12E-Wachstumskurven unter verschiedenen TNF-alpha-Konzentrationen aufgenommen wurden (Abb. 28), zum anderen ein *in vivo* Experiment (Abb. 29). Sensitive Tumorzellen reagierten bereits in der Anwesenheit von TNF-alpha im picomolaren Konzentrationsbereich.

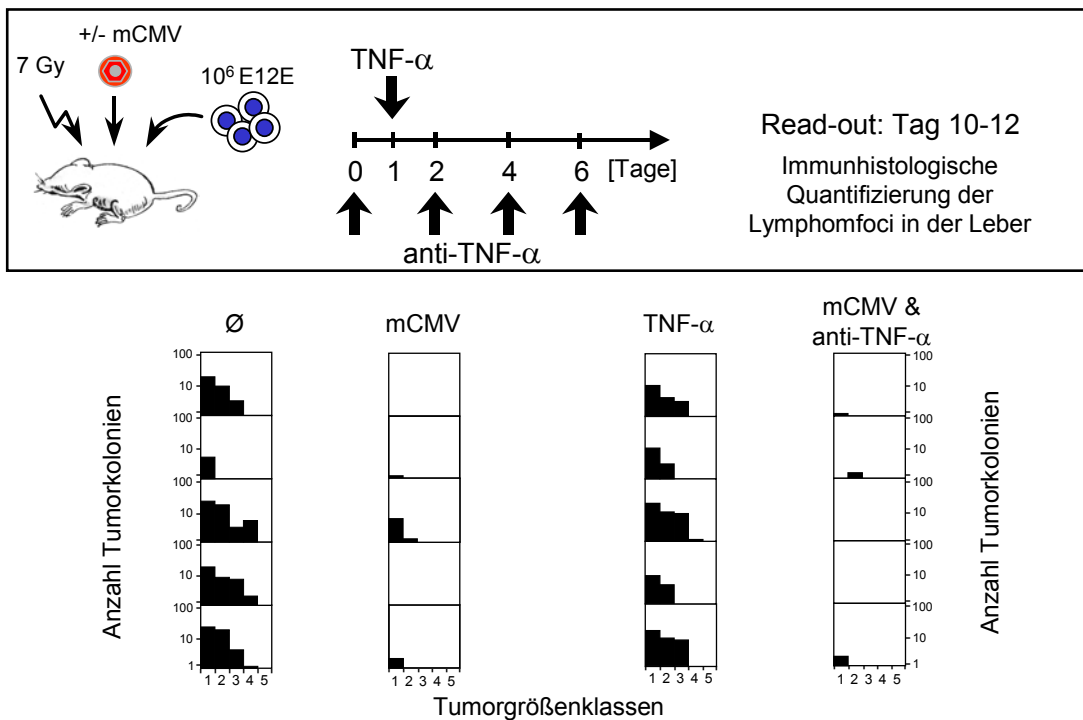


**Abbildung 28: Zellwachstumskurven von E12E *in vitro* unter Zugabe von rmTNF-alpha.** E12E-Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Nach 24 Stunden wurde erstmals die Zahl der Zellen bestimmt. Die folgenden Zellzählungen wurden in 12-Stunden-Intervallen durchgeführt. (Ø) Wachstumskurve in Abwesenheit von rmTNF-alpha. Pfeile zeigen den Zeitpunkt der TNF-alpha-Zugabe. [pM] = TNF-alpha-Konzentration.

Der *in vitro* Versuch zeigte, dass murines rekombinantes (rm) TNF-alpha selbst bei einer Konzentration von 500pM keinen Einfluss auf das Wachstum des E12E-Lymphoms hatte.

Im Tierversuch sollte der *in vivo* Einfluss von TNF-alpha untersucht werden. Dazu wurden die Tiere mit murinem rekombinatem TNF-alpha oder mit anti-TNF-alpha-Antikörpern behandelt.

Sollte TNF-alpha den antitumoralen Effekt von mCMV vermitteln, so müsste das Tumorstadium in den nicht infizierten Tieren deutlich eingeschränkt sein. Umgekehrt sollte die Gabe von anti-TNF-alpha-Antikörpern in infizierten Tieren den antitumoralen mCMV-Effekt aufheben (Abb. 29).



**Abbildung 29: Einfluss von TNF-alpha auf das E12E-Tumorstadium *in vivo*.**

Quantitative Analyse des E12E-Wachstums in der Leber. Zu den gezeigten Zeitpunkten wurden die Tiere mit TNF-alpha bzw. anti-TNF-alpha behandelt. Anzahl und Größe der Tumoren wurde in 100 mm<sup>2</sup> Leber mittels IHC B220 bestimmt. Pro Gruppe wurden 5 Tiere analysiert.

Um eine möglichst schnelle Aussage über einen etwaigen antitumoralen Effekt zu bekommen, wurde ein „Kurzzeitassay“ entwickelt. In diesem Assay war eine Analyse des Tumorstadiums bereits nach 7-12 Tagen möglich. Die Tiere bekamen in diesem Versuchssystem keine KMZ transplantiert, sondern wurden lediglich hämatoablativ behandelt und konnten optional mit mCMV infiziert werden.

Die Tiere wurden ein Tag vor der Tumorgabe mit 7 Gy bestrahlt. Jedes Tier erhielt  $10^6$  E12E-Zellen und anschließend wurde ein Teil der Tiere mit  $10^5$  pfu mCMV infiziert. Die Mäuse der Virusgruppen, die zusätzlich  $1\mu\text{g}$  TNF-alpha (in  $500\mu\text{l}$ ) erhielten, bekamen dieses am Tag nach der Tumorgabe intravenös injiziert. Die Tiere, die infiziert wurden und zusätzlich Antikörper gegen TNF-alpha erhielten, um den antitumoralen Effekt wieder aufzuheben, bekamen den Antikörper i. v. am Tag der Tumorgabe sowie 2, 4 und 6 Tage danach. Die Dosis des Antikörpers wurde so gewählt, dass mit jeder Gabe 40ng murines TNF-alpha neutralisiert werden konnten.

Auch im Tierversuch konnte kein antitumoraler Einfluss von TNF-alpha nachgewiesen werden. Die einmalige Gabe von rmTNF-alpha führte zu keinem Rückgang des Tumorwachstums. In Übereinstimmung damit verhinderten anti-TNF-alpha-Antikörper im infizierten Tier den antitumoralen mCMV-Effekt nicht.

Resümee:

TNF-alpha ist nicht für den antitumoralen mCMV-Mechanismus verantwortlich.

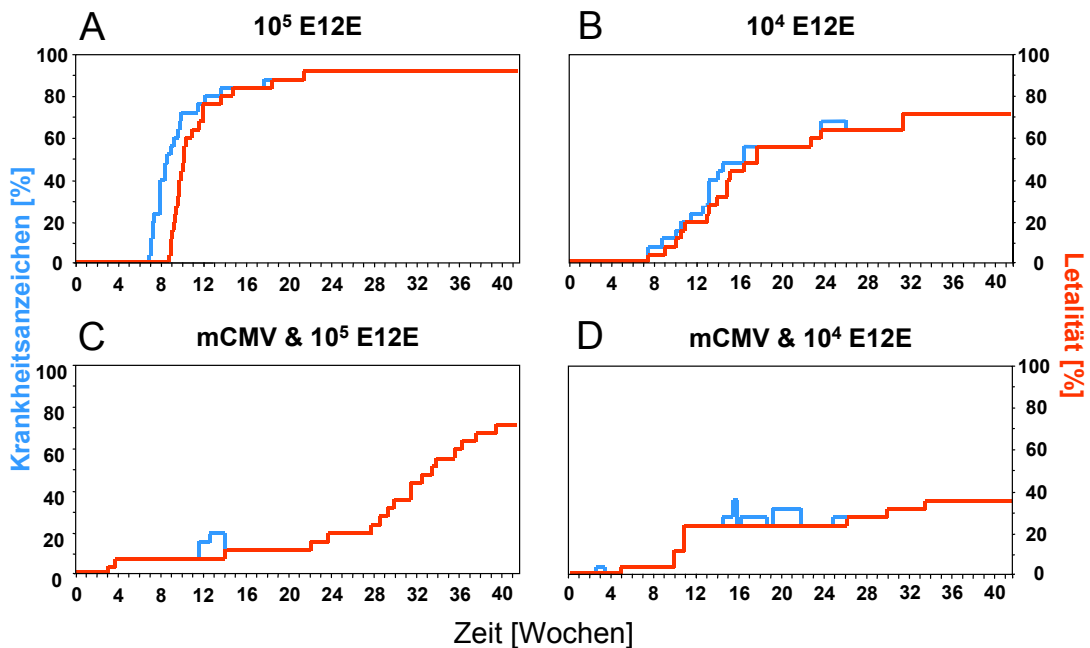
### **3.11 Langfristige Beobachtung von Tieren mit geringer initialer E12E-Tumorzelllast**

Die bisherigen Versuche waren mit einer sehr hohen Tumorlast ( $10^6$  Zellen i.v.) durchgeführt worden. Die Infektion konnte zwar die Tumorprogression deutlich verzögern, aber nicht verhindern. Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass ein Teil der Tumorzellen der antitumoralen Wirkung des Virus entkam.

Im folgenden Versuch (Abb. 30) wurden den Tieren daher statt  $10^6$  E12E-Zellen nur  $10^5$  bzw.  $10^4$  Zellen i. v. appliziert. Die Tiere wurden am Tag vor der Transplantation und Tumorgabe mit 7 Gy bestrahlt. Alle Rezipienten erhielten  $2 \times 10^6$  KMZ. Die Infektion erfolgte i. pl. mit  $10^5$  pfu mCMV.

Der Versuch wurde schließlich nach 42 Wochen beendet. Die Milzen der überlebenden Tiere waren frei von Tumorzellen; es gelang nicht, Tumorzellen durch Zellkultur zu reisolieren.

Die Analyse der Lebern derselben Tiere mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*) auf die Präsenz des Reportergens *lacZ* war ebenfalls negativ (Daten nicht gezeigt).

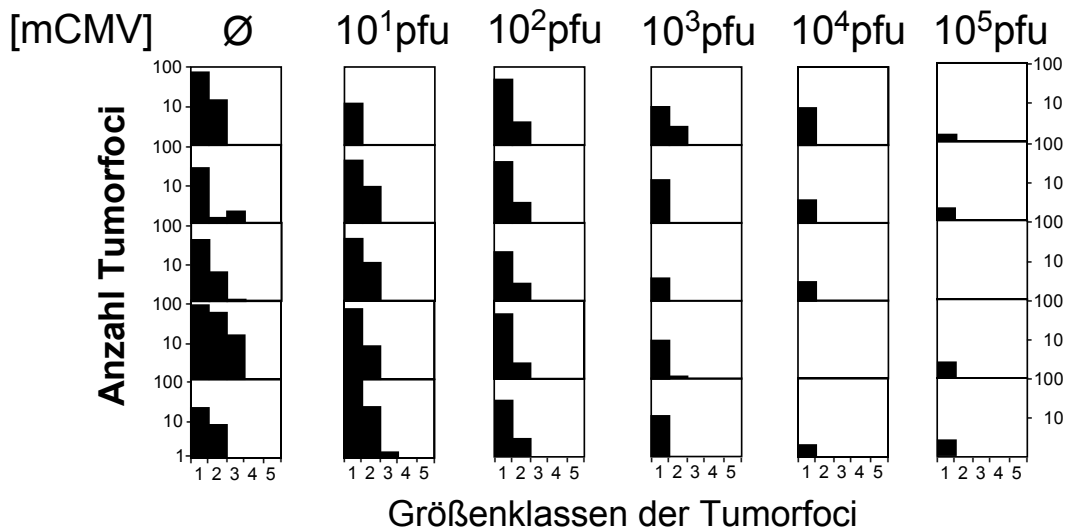


**Abbildung 30: Einfluss einer verringerten Tumorlast auf das Versterben der Tiere.** Sterbekurve (rot) und Krankheitskurve (blau). Tiere wurden hämatoablativ (7 Gy) behandelt und bekamen anschließend 10<sup>5</sup> Tumorzellen (i.v.) (links) oder 10<sup>4</sup> Tumorzellen (i.v.) (rechts) injiziert. In weiteren Versuchsgruppen wurden die Tiere mit mCMV infiziert (untere Bilder). N = 25/Gruppe.

Bei der Gabe einer geringeren Dosis (10<sup>4</sup> und 10<sup>5</sup> Zellen/Tier) kam es, verglichen mit der hohen Tumorlast von 10<sup>6</sup> Zellen (vgl. Abb. 15), zu einer verzögerten Tumorentwicklung in den Tieren. Jedoch verstarben letztlich die Mehrheit der Tiere. Die Infektion mit mCMV führte auch unter diesen Bedingungen zu einer deutlichen Verlangsamung der Tumorprogression und, insbesondere bei der geringen Tumorlast von 10<sup>4</sup> E12E-Zellen, auch zu einer signifikanten Senkung der Sterberate.

### 3.12 Minimale effektive Wirkdosis von mCMV

Die bisher gezeigten Daten waren alle mit einer Infektionsdosis von 10<sup>5</sup> pfu mCMV durchgeführt worden. Der folgende Versuch sollte nun zeigen, wie weit man die Dosis des Virus verringern kann, um noch einen antitumoralen Effekt zu erreichen. Der Einfluss einer Virusdosis von 10 bis 10<sup>5</sup> pfu auf die Tumorentwicklung wurde in hämatoablativ behandelten Tieren untersucht (Abb. 31).



**Abbildung 31: Einfluss der mCMV-Infektionsdosis auf das Tumorstadium.**

Tiere wurden hämatoablativ (7 Gy) behandelt und bekamen  $10^6$  Tumorzellen injiziert. Anschließend wurden die Tiere mit verschiedenen Dosierungen mCMV behandelt. Kontrolltiere erhielten kein Virus ( $\emptyset$ ). N = 5/Gruppe. Die Sektion der Tiere erfolgte am 12. Tag nach Infektion.

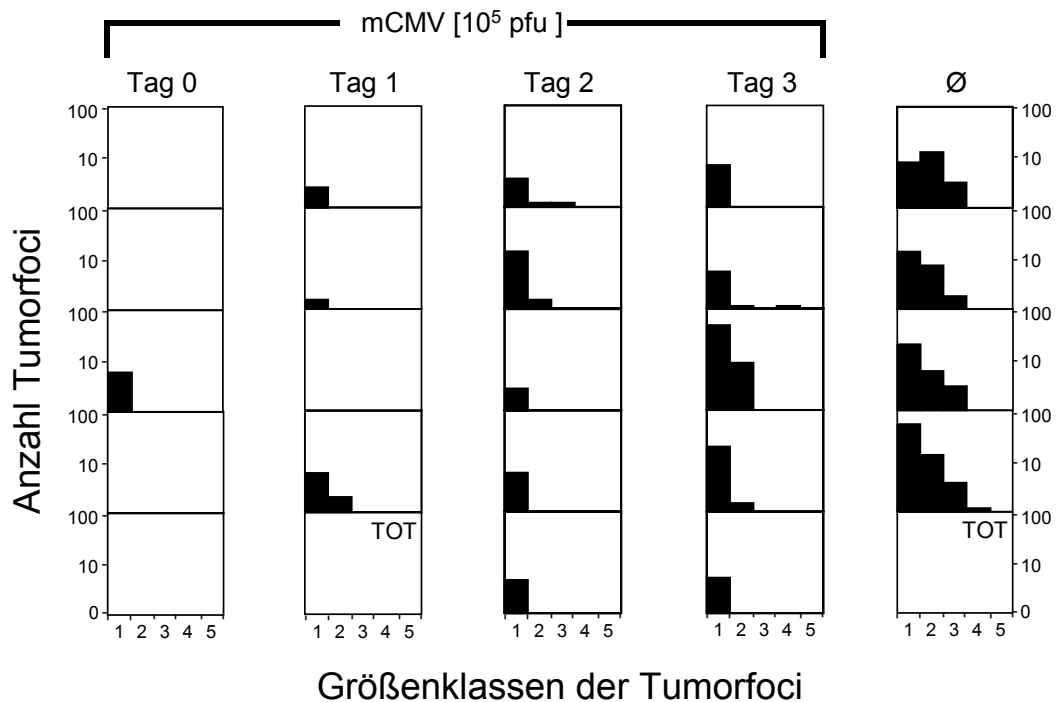
Dazu wurden die Tiere am Tag vor der Tumorgabe mit einer Bestrahlungsdosis von 7 Gy hämatoablativ behandelt. Allen Tieren wurde  $10^6$  E12E-Lymphomzellen intravenös appliziert. Anschließend erfolgte die intraplantare (i. pl.) Infektion mit verschiedenen Dosierungen von mCMV.

Der Versuch zeigte, dass die Wirkung bei einer mCMV-Dosis von  $10^3$  pfu einsetzt. Eine Infektion mit nur  $10^4$  pfu mCMV (i. pl.) führt in den Tieren bereits zu einem deutlichen antitumoralen Effekt.

### 3.13 Zeitpunkt der Infektion

Es konnte im vorhergehenden Kapitel gezeigt werden, dass eine um das 10fache niedrigere Infektionsdosis als die Standardinfektionsdosis ( $10^5$  pfu/Tier) noch zu dem antitumoralen Effekt führt.

Als nächstes wurde nun untersucht, inwieweit eine zeitliche Verschiebung des Infektionszeitpunktes noch zu dem antitumoralen mCMV-Effekt führt. Dazu wurden die Tiere mit  $\gamma$ -Bestrahlung (7Gy) hämatoablativ behandelt und am Tag der Tumorgabe (Tag 0), sowie an den Tagen 1, 2 und 3 nach Tumorgabe mit mCMV infiziert (Abb. 32). Die Kontrolltiere wurden nicht infiziert.



**Abbildung 32: Einfluss des Zeitpunktes der mCMV-Infektion auf das Tumorwachstum.** Tiere wurden hämatoablativ (7 Gy) behandelt und bekamen  $10^6$  Tumorzellen injiziert. An den Tagen 0, 1, 2 und 3 wurden die Tiere mit mCMV infiziert. Kontrolltiere erhielten kein Virus (Ø). N = 5 Tiere/Gruppe. Die Sektion der Tiere erfolgte am 12. Tag nach Infektion.

Tiere, die an den Tagen 0, 1 und 2 nach Tumorgabe infiziert wurden, zeigten ein deutlich verringertes Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wurden die Tiere erst an Tag 3 infiziert, war der antitumorale mCMV-Effekt bereits deutlich verringert, aber immer noch signifikant, insbesondere im Vergleich der histologischen Originaldaten (nicht gezeigt).

Resümee:

Die Tumorbesiedelung der Leber wurde insbesondere dann reduziert, wenn die Infektion innerhalb von 2 Tagen nach Gabe der Tumorzellen erfolgte. Eine Infektion am 3. Tag nach Tumorgabe hatte bereits eine deutlich geringere antitumorale Wirkung.

### 3.14 Serum als Mediator des antitumoralen Effektes

Auf der Basis der bisherigen Erkenntnisse schien eine Inhibition der Extravasation der Tumorzellen aufgrund einer gestörten Kommunikation zwischen Tumorzelle und dem sinusoidalen Endothel der Leber am wahrscheinlichsten. Die transendotheliale Migration/Diapedese könnte aufgrund veränderter Expression von Adhäsionsmolekülen/Selektinen und Integrinen verändert sein. Ebenso wäre eine funktionelle Defizienz der Tumorzellen z. B. durch eine reduzierte Expression der Matrixmetalloproteinasen denkbar.

Als Induktoren kommen ein Virus-kodierter Faktor („Virokin“) oder ein Virus-induziertes, von Stromalen Zellen am Infektionsort sezerniertes Zytokin in Betracht.

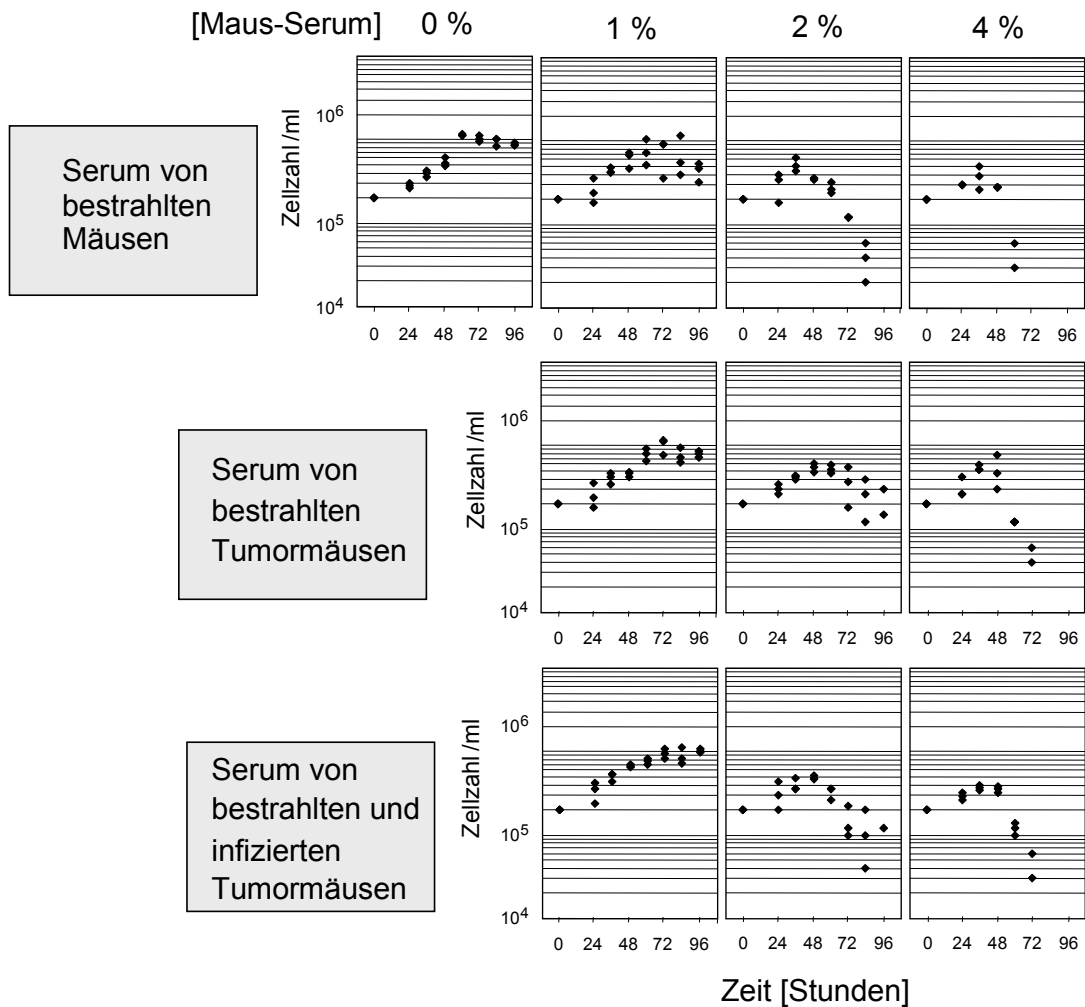
Anhand von E12E-Wachstumskurven wurde in Zellkultur getestet, ob Serum infizierter Tiere auf Tumorzellen zytostatisch oder zytotoxisch wirkt.

In einem ersten Versuch wurde das Serum von drei Tiergruppen gewonnen. Das Blut wurde den Tieren 24 Stunden nach Behandlung entnommen:

1. Tieren, die lediglich hämatoablativ behandelt wurden.
2. Tieren, die hämatoablativ behandelt wurden und Tumorzellen bekamen ( $10^6$  Zellen/Tier).
3. Tieren, die hämatoablativ behandelt wurden, Tumorzellen bekamen und infiziert wurden ( $10^5$  pfu/Tier).

Das Serum der Tiergruppen wurde in einer Konzentration von 4%, 2% und 1% dem Zellkulturmedium zugegeben.

Grundsätzlich hemmte das Serum in einer Konzentration von mehr als 1% das Tumorstadium. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Seren bestrahlter, infizierter und nicht infizierter Tiere festgestellt werden (Abb. 33).

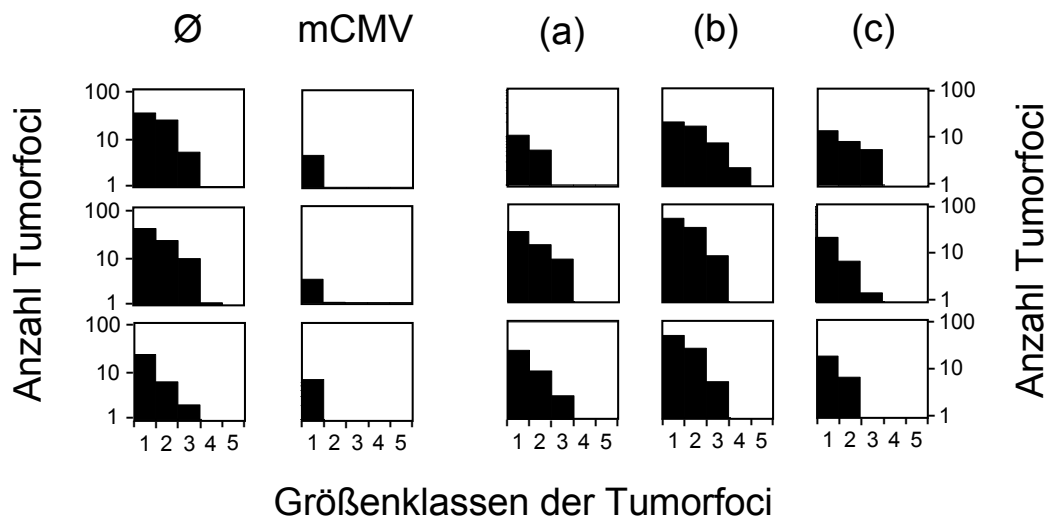


**Abbildung 33: Zellwachstumskurven von E12E *in vivo* unter Zugabe von murinem Serum.**

E12E-Zellen wurden in 24-Well-Platten in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät. Nach 24 Stunden wurde erstmals die Zellzahl bestimmt. Die folgenden Zellzählungen wurden in 12-Stunden-Intervallen durchgeführt. Wachstumskurve in Abwesenheit von Mäuseserum (0%). Am Zeitpunkt 24h erfolgte die Zugabe von 4, 2 oder 1% Serum.

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass Hitze-inaktiviertes 10%iges Mausserum (einstündige Inkubation in  $56^\circ\text{C}$ -Wasserbad) in Zellkultur das Wachstum der E12E-Zellen nur geringfügig beeinträchtigt und auf die Zellen nicht zytotoxisch wirkt (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurden denkbare Mechanismen *in vivo* überprüft. Die Tiere wurden hämatoablativ (7 Gy) behandelt und bekamen  $10^6$  Tumorzellen, die verschieden vorbehandelt wurden, injiziert. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse im einzelnen:



**Abbildung 34: Einfluss verschiedener Komponenten auf das Tumorwachstum.**

Tiere wurden hämatoablativ (7 Gy) behandelt und bekamen  $10^6$  Tumorzellen, die verschieden behandelt wurden, injiziert. (a) Vorinkubation der Tumorzellen mit UV-inaktiviertem Virus (10 pfu-UV/Zelle). (b) Übertragung von Serum infizierter Spender auf nicht infizierte Rezipienten kurz nach Gabe der Tumorzellen. (c) Vorinkubation der Tumorzellen in Serum infizierter Tiere. Kontrolltiere erhielten kein Virus (Ø) bzw.  $10^5$  pfu mCMV. N = 3 Tiere/Gruppe.

Eine einstündige Vorinkubation der Tumorzellen mit UV-inaktiviertem Virus (10 pfu mCMV<sup>UV</sup>/Zelle) erfolgte bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden die Tumorzellen 3mal mit Medium (ohne Zusätze) gewaschen. Mit diesem Versuchsansatz sollte geklärt werden, ob die Signalgebung in die Tumorzelle oder eine Absättigung von Rezeptoren auf der Tumorzelle dazu führt, dass die Tumorzelle nicht mehr an das Endothel binden kann.

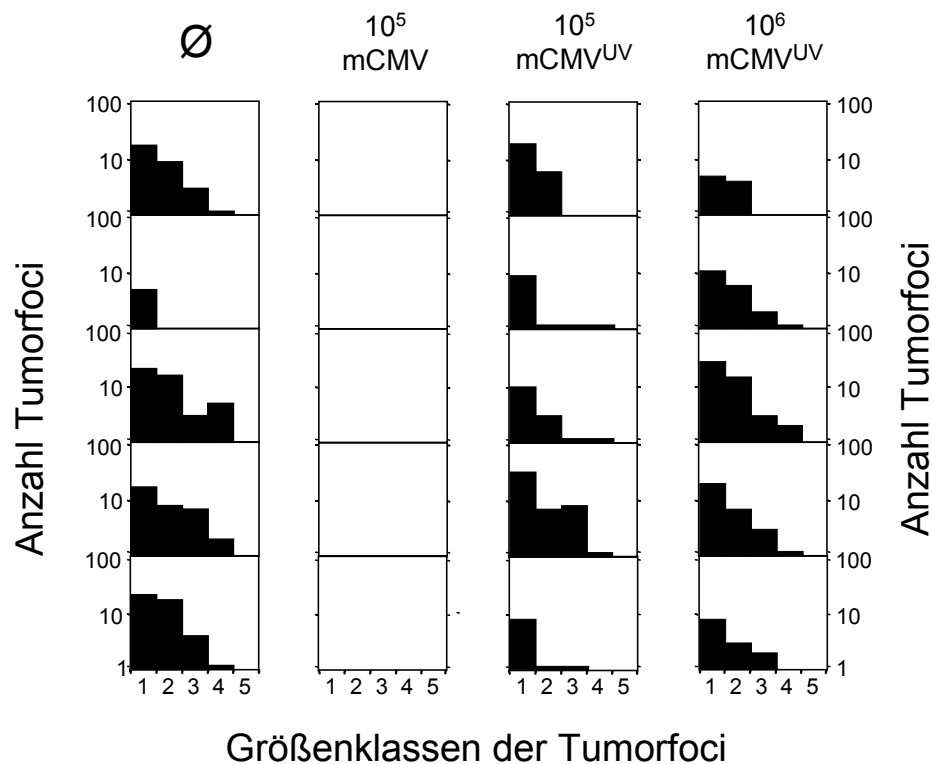
Übertragung von Serum infizierter Spender auf nicht infizierte Rezipienten (500µl/Tier i. v.) drei Stunden nach Gabe der Tumorzellen. Das Serum wurde zuvor für 30 Minuten mit UV-Licht behandelt, um eventuell vorhandenes Virus zu inaktivieren. Ein Virokin oder Zytokin aus dem Serum könnte die Expression endothelialer Rezeptoren modulieren.

Einstündige Vorinkubation der Tumorzellen in Serum infizierter Tiere ( $10^6$  Zellen/500µl Serum) mit der Idee, im Serum enthaltenes Virokin oder Zytokin würde die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Tumorzellen modulieren. Anschließend wurden die Tumorzellen 3mal mit Medium (ohne Zusätze) gewaschen.

Keines der drei Protokolle hatte einen signifikanten Einfluss auf die Kolonisierung der Leber durch das E12E-Lymphom. Der Versuch gab keinen positiven Hinweis auf die Existenz des vermuteten Virokins oder Zytokins im Serum der Tiere. Ferner liegt der Versuch nahe, dass der antitumorale Effekt nicht auf die Tumorzelle selbst einwirkt.

### 3.15 Intraplantare Gabe von mCMV<sup>UV</sup>

Mittels des nächsten Experimentes sollte die Frage geklärt werden, ob für den antitumoralen Mechanismus replikatives Virus nötig ist. Hierzu wurde das Virus zuvor einer 30-minütigen UV-Bestrahlung bei 254nm ausgesetzt, was zur Schädigung der DNA führt. Es könnte sein, dass Proteine aus der mCMV-Hülle oder andere virale Strukturproteine zu diesem Effekt führen.



**Abbildung 35: Intraplantare Gabe von UV-inaktiviertem mCMV.**

Tiere wurden hämatoablativ (7 Gy) behandelt und bekamen 10<sup>6</sup> Tumorzellen injiziert. Den Versuchstieren wurde mit UV-inaktiviertes mCMV intraplantar appliziert. Kontrolltiere erhielten kein Virus (Ø) bzw. nicht inaktiviertes mCMV (10<sup>5</sup>pfu/Tier). N = 5 Tiere/Gruppe. Die Sectio der Tiere erfolgte am 12. Tag nach Tumorgabe.

Die Abbildung zeigt die Entwicklung der E12E-Tumorkolonien in der Leber  $\gamma$ -bestrahlter (7 Gy) Rezipienten an Tag 12 nach Tumorgabe ( $10^6$  Zellen/Tier i.v.) und intraplantarer Infektion. Die Tiere wurden am Tag vor der Tumorgabe hämatoablativ behandelt. Etwa zwei Stunden nachdem die Tiere die Tumorzellen intravenös injiziert bekamen, wurde den Tieren das UV-bestrahlte Virus oder das unbehandelte mCMV appliziert. Die Applikation des replikativen und inaktivierten Virus erfolgte intraplantar.

Für einen antitumoralen Mechanismus von mCMV war unter den oben gewählten Bedingungen infektiöses Virus erforderlich. Nach subkutaner Applikation zeigte UV-inaktiviertes Virus auch nach Erhöhung der Dosis um den Faktor 10 keinen Effekt.

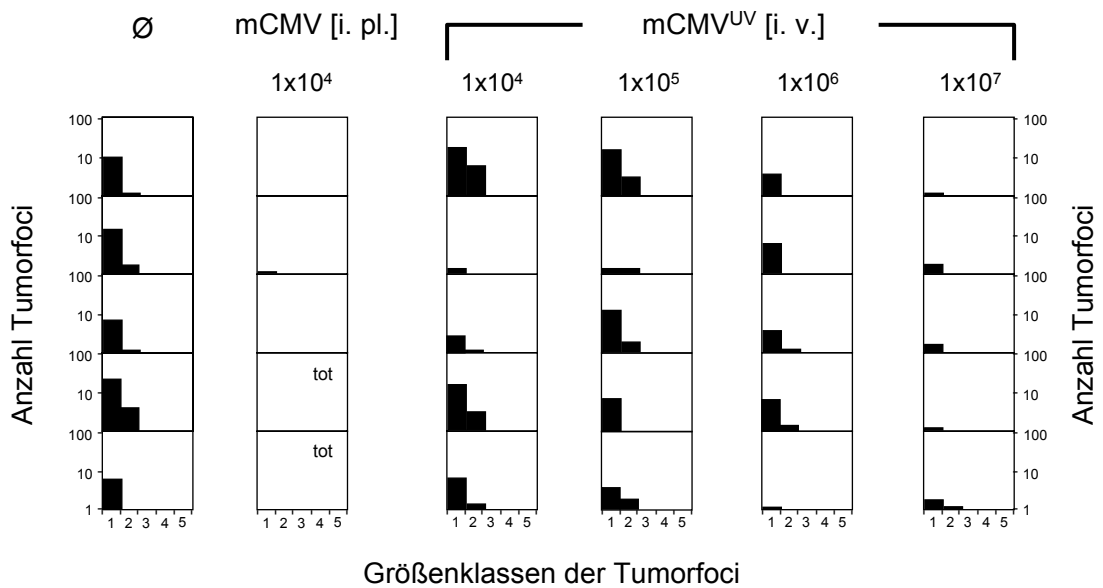
Resümee:

UV-inaktiviertes Virus ist nach intraplantarer Applikation unwirksam.

### **3.16 Intravenöse Gabe von mCMV<sup>UV</sup>**

Während UV-inaktiviertes Virus nach intraplantarer Applikation unwirksam war, sollte nun geklärt werden, ob die intravenöse Gabe das Tumorstadium beeinflusst.

Die Tiere wurden am Tag vor der Tumorgabe einer hämatoablativen Bestrahlung mit einer Dosis von 7 Gy unterzogen. Jedes Tier erhielt  $10^6$  E12E-Zellen. Nach etwa 6 Stunden wurde Virus appliziert. Die Kontrollgruppe, die replikatives Virus erhielt, bekam dieses intraplantar appliziert. UV-inaktiviertes Virus wurde dagegen intravenös verabreicht (Abb. 36).



**Abbildung 36: Die intravenöse Gabe von UV-inaktiviertem mCMV führt zu einem antitumoralen Effekt.**

Tiere wurden hämatoablativ (7 Gy) behandelt und bekamen  $10^6$  Tumorzellen injiziert. Die Versuchstiere wurden mit verschiedenen Dosierungen mCMV<sup>UV</sup> ( $10^4$  bis  $10^7$  pfu/Tier i.v.) inokuliert. Kontrolltiere erhielten kein Virus (Ø) bzw. infektiöses mCMV ( $10^5$  pfu/Tier i. pl.). N = 5 Tiere/Gruppe. Die Sectio der Tiere erfolgte am 12. Tag nach Tumorgabe.

Während UV-inaktiviertes Virus nach intraplantarer Gabe unwirksam war, konnte es nach intravenöser Applikation die Besiedelung der Leber durch E12E-Zellen reduzieren. Allerdings kommt es erst bei einer Gabe von  $10^6$  bis  $10^7$  pfu i.v. zu diesem antitumoralen Effekt.

Eine immunhistologische Untersuchung des Infektionsgrades der Leber zeigte, dass die UV-Inaktivierung des Virus vollständig war, da die Lebern der Tiere alle frei von Infektion waren. Es ist bekannt, dass schon 10 pfu mCMV i. v. ausreichend sind, um eine deutliche Infektion in der Leber zu induzieren. Zudem sind für einen antitumoralen Effekt mindestens  $10^3$  pfu mCMV i. v. notwendig. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Wirkung auf Restinfektiosität zurückgeführt werden kann.

Resümee:

Der antitumorale Effekt muss unter diesen Versuchsbedingungen durch virale Strukturproteine (Virion-Proteinen) ausgelöst werden. Der Ort der antitumoralen Wirkung liegt vermutlich am Endothel der Leber.

## 4 Diskussion

Eine Infektion mit CMV und ein Tumorrezidiv sind zwei Hauptkomplikationen bei der Therapie hämatopoetischer Tumoren durch KMT. Umso überraschender war die Feststellung, dass bisher der Einfluss von CMV auf ein Tumorrezidiv kaum untersucht worden ist. In einer Vielzahl von Studien findet man Untersuchungen zum Tumorrezidiv oder zur rekurrenten CMV-Infektion, jedoch nicht zu einer möglichen Interaktion zwischen beiden.

Einzig die Arbeitsgruppe um Fujiwara untersuchte in einer klinischen Studie anhand der Überlebensraten von Patienten mit einer T-Zell-Leukämie (akute lymphatische T-Zell-Leukämie, ATLL) einen Zusammenhang. Dabei zeigte sich, dass die Patienten, die an CMV erkrankten, länger überlebten (Fujiwara et al., 2000; Fujiwara et al., 2001). Kam es bei diesen Patienten zu einem frühen Zeitpunkt nach KMT zu einer CMV-Reaktivierung, wurde die ATLL-Aktivität unterdrückt. Damit ging eine temporäre Remission der ATLL einher. Über einen möglichen Mechanismus, der zu diesem positiven Effekt führte, machten Fujiwara und Mitarbeiter keine Aussagen. Sie diskutierten jedoch, dass die Genexpression von hCMV mit der Replikation von HTLV-1 (*human T lymphotropic virus type 1*) interferieren könnte. HTLV-1 ist in die Entstehung von ATLL involviert. Es ist bereits seit etwa 10 Jahren bekannt, dass Viren an der Ätiologie von Leukämien beteiligt sein können (zur Hausen, 1991). HTLV-1 gelangt nach Infektion in CD4/CD25 positive T-Zellen (T-Lymphozyten), die es auch *in vitro* infizieren kann. In diesen Zellen kann das Virus jahrelang persistieren. Die persistent infizierten Lymphozyten werden durch das Virus nicht lysiert. Sie sind jedoch in ihren Wachstumseigenschaften verändert und können zu Klonen auswachsen, die im Patienten auch nach vielen Jahren noch nachweisbar sind (Etoh et al., 1997). Trotz der Veränderungen bleibt das infizierte Individuum über Jahrzehnte hinweg symptomfrei und wird während dieser Zeit als *Carrier* bezeichnet. Letztendlich entsteht aus den persistent infizierten Zellen die ATLL.

Die Existenz einer Wechselbeziehung zwischen CMV und einem Lymphom war Ausgangshypothese der vorliegenden Doktorarbeit. Dabei war jedoch völlig offen, ob eine CMV-Infektion das Risiko eines Tumorrezidivs vermindern oder erhöhen würde. Um diese Frage in einem Versuchssystem bearbeiten zu können, erweiterten wir das in Vorarbeiten gut etablierte Modell der mCMV-Infektion nach experimenteller syngener KMT mit dem Mausstamm BALB/c als Spender und Empfänger (Reddehase et al., 1985; Holtappels et al., 1998; Podlech et al., 1998; Steffens et al., 1998a; Steffens et al., 1998b; Podlech et al., 2000) durch ein B-Zell-Lymphom als zusätzlichen Parameter. Als Modell-Lymphom diente eine von uns selektionierte, mit dem Reportergen *lacZ* versehene Variante des B-Zell-Lymphoms A20. Der Klon E12E entstand durch *ex tumore* Reklonierung eines A20-*lacZ* Klons. E12E siedelt

sich nach intravenöser Gabe bevorzugt in der Leber an und ist hochgradig tumorigen.

In diesem Modellsystem wurden die Rezipienten zunächst einer Ganzkörper- $\gamma$ -Bestrahlung unterzogen, die für die Tiere normalerweise letal ist. Durch die Gabe von KMZ wurden die Blutbildung und damit auch das Immunsystem der Tiere wieder rekonstituiert. Die Rezipienten erhielten KMZ von syngenen BALB/c-Spendertieren. Gleichzeitig wurden den Rezipienten zusätzlich Tumorzellen intravenös injiziert (Erlach et al., 2002). Je nach Fragestellung erfolgte eine Infektion mit mCMV vor oder nach Transplantation und Tumorgabe.

### **Wahl der Tumorzelle**

Bei der Wahl des Tumors zur Ergänzung des Modells wurden zwei wichtige Aspekte berücksichtigt. Zum einen ist eine minimale residuale Leukämie (*Minimal Residual Leukemia*, MRL) Ausgangspunkt einer der gravierendsten Komplikationen bei der KMT, nämlich dem Rezidiv (Radich et al., 2000; Sievers & Radich, 2000). In der klinischen Situation entsteht das Rezidiv aus residualen Tumorzellen (MRL), welche die zytotoxische Therapie vor KMT überlebt haben. Um diesem Umstand gerecht zu werden, mussten wir einen zum Rezipienten syngenen Tumor wählen.

Zum anderen ist ein Malignom des hämatopoetischen Systems eine Erkrankung, die immer häufiger durch eine KMT therapiert wird. Deshalb wählten wir eine Leukämie bzw. ein Lymphom als Modell. Wir entschieden uns für die Zell-Linie A20 (Kim et al., 1979), eine B-Zell Lymphomlinie aus der BALB/c Maus (Haplotyp H-2<sup>d</sup>; Karyotyp diploid, weiblich).

### **Tumorzellmarker**

Wie bereits beschrieben kann nach hämatoablativer Behandlung von Leukämiepatienten eine MRL entstehen, aus der sich ein Tumorrezidiv entwickeln kann. Im Mausmodell besteht die Parallele zu dieser klinischen Situation im Einbringen der Tumorzellen. Um nun das Schicksal dieser Tumorzellen verfolgen zu können, war ein spezifischer Marker zum Nachweis erforderlich. Da die von uns ausgewählte A20-Tumorzelllinie ursprünglich einer weiblichen BALB/c-Maus entstammt, besitzt sie kein Y-Chromosom, anhand dessen sie in einer weiblichen Empfängermaus mittels PCR hätte nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund wurde in die A20-Zellen als Marker das *lacZ*-Gen eingeführt (Gorman et al., 1982; Price et al.,

1987), um beispielsweise eine Elimination des Tumors oder auch eine MRL verfolgen zu können.

Der Vorteil des *lacZ*-Gens als Reportereinheit liegt in der Einfachheit und der Vielfältigkeit des Nachweises. Das *lacZ*-Gen-Produkt, die  $\beta$ -Galaktosidase, lässt sich immunhistologisch in Gefrier- und Paraffinschnitten nachweisen. Dadurch wird eine direkte Lokalisation der Tumorzellen im Gewebe ermöglicht (Sanes et al., 1986). Des Weiteren kann man *lacZ*-positive Zellen (aus der Zellkultur) mit einer  $\beta$ -Gal-Vitalfärbung markieren und sie im FACS anschließend sortieren (Nolan et al., 1988), ohne die Zellen dabei abzutöten. Molekularbiologisch lässt sich eine für das *lacZ*-Markergen spezifische PCR durchführen. Mittels dieser Reporter-*PCR* kann eine sehr geringe Anzahl von Tumorzellen nachgewiesen werden. Dadurch wird die Unterscheidung, ob bestimmte Organe der Tiere frei von Tumor sind oder ob noch residuale „schlafende“ Tumorzellen (*Tumor Dormancy*) in den Organen der Tiere vorhanden sind, möglich.

## Transfektion und Klonierung

Die Transfektion der *lacZ*-DNA erfolgte mittels Elektroporation in die A20-Zellen. Die transfizierten Zellen wurden dann in G418-haltigem Medium kultiviert. Die *lacZ*-Expression der transfizierten Zellen wurde mittels der X-Gal-Färbung überprüft. Es zeigte sich, dass 85% der Zellen das Reportergen exprimierten. Um Zellklone zu erhalten, die möglichst eine 100%ige  $\beta$ -Gal-Expression aufweisen sollten, wurden die A20-*lacZ*-Zellen einer *limiting dilution*-Klonierung unterzogen.

Aus dieser Klonierung gingen Klone hervor, deren Zellen entweder keine, eine partielle oder eine 100%ige  $\beta$ -Gal-Expression zeigten. Es zeigte sich, dass 17% der untersuchten Klone (15 von 88 Klonen) in Zellkultur eine stabile Expression aufwiesen, die auch ohne Selektion stabil blieb. Dreißig Prozent der A20-*lacZ*-Klone zeigte Variegation in der Expression des Reportergens.

Das Phänomen der Variegation wurde bereits von Montoliu et al. (2000) beschrieben, der verschiedene Erklärungsmöglichkeiten gibt. Zum einen könnte die Variegation durch das natürlich vorkommende, stochastische *Silencing* von Genen in Säugetierzellen erklärt werden oder durch einen Genort im Zellgenom, dessen Expression herunterreguliert wurde. Weiterhin könnten regulatorische Elemente, die für die Expression des *lacZ*-Gens wichtig sind, verloren gegangen sein oder eine Methylierung der Zell-DNA auftreten, welche die Variegation hervorruft.

Tatsächlich konnte mittels *lacZ*-PCR gezeigt werden, dass auch reine *Non-Expressor*-Linien, die zu Beginn keine Blaufärbung zeigten, das *lacZ*-Gen trugen. Interessanterweise kam es im Verlauf der Klonierung zu einer teilweisen Aufhebung

dieses *Gene Silencing*: einzelne *Non-Expressor*-Klone exprimierten ab einem bestimmten Zeitpunkt das Gen.

### ***In vivo*-Testung der A20-Subklone**

Ein Teil der Klone wurde dann *in vivo* an immunsupprimierten Tieren getestet, um mögliche Unterschiede in den Eigenschaften der Klone festzustellen und einen für unser Mausmodell geeigneten Klon auszuwählen. Drei der ausgewählten Klone zeigten eine 100%ige *in vitro*-Expression. Unabhängig von der Expression der  $\beta$ -Galaktosidase waren die A20-*lacZ*-Klone in ihrer *in vivo* Pathogenität attenuiert - allerdings in sehr unterschiedlichem Ausmaß.

In einem folgenden Tierversuch wurden diese A20-*lacZ*-Linien auf ihre Tumorigenität und ihre  $\beta$ -Gal-Expression *in vivo* untersucht. Dazu wurden sie immunsupprimierten Tieren intravenös appliziert.

Zu einem Zeitpunkt, an dem bereits große Tumorfoci in den Lebern der Tiere gebildet worden waren, wurden ihnen die Lebern entnommen. Aus einem kleinen Teil der Leber wurden dann die Tumorzellen rekultiviert. Der andere Teil der Leber wurde immunhistologisch untersucht. Durch keine der beiden Methoden konnte eine Korrelation zwischen der Stärke der  $\beta$ -Gal-Expression bzw. dem Anteil der exprimierenden Tumorzellen und der Tumorigenität der einzelnen Klone nachgewiesen werden. Es kam zu einem sehr schnellen *in vivo-Silencing* des Reportergens und einer Variegation der  $\beta$ -Gal-Expression in den Tumorzellen. Lediglich der Klon IID11 zeigte mehr als 20% blaue Zellen *in situ* und bildete zahlreiche Kolonien in der Leber.

Die von uns generierten Transfektanden unterschieden sich von analog generierten T-Zelllymphom-Transfektanden anderer Arbeitsgruppen deutlich (Kruger et al., 1999). Bei diesen war nämlich gezeigt worden, dass sich das *lacZ*-Gen hervorragend zur histochemischen und FACS-Visualisierung von Mikrometastasen und somit zur *Tumor Dormancy* eignete.

Von diesen IID11-Tumorzellen aus Tumorfoci der Leber eines der Tiere erwarteten wir eine höhere  $\beta$ -Gal-Expression und einen verbesserten Lebertropismus. Die Tumorzellen wurden deshalb isoliert und anschließend *ex tumore* kloniert. Das Resultat dieser *ex tumore*-Klonierung waren 58 Klone. Sie zeigten wiederum eine unterschiedliche  $\beta$ -Gal-Expression. Mehr als ein Viertel der erhaltenen Klone zeigte hier jedoch eine *lacZ*-Expression von 100%.

Auch die *ex tumore* isolierten, nicht exprimierenden Zellen trugen das Reporter-gen, was mit der *PCR* gezeigt werden konnte. Dem Phänomen des *in vivo Silencing* (bei gleichzeitig stabiler Expression in Zellkultur) sind wir nicht weiter nachgegangen, da wir uns damit von der eigentlichen Frage des Projektes zu weit entfernt hätten. Es steht jedoch eine große Auswahl an transfizierten A20-Klonen für weitere tumorbiologische Analysen zur Verfügung.

Im Folgenden wurden dann einige dieser verschieden stark  $\beta$ -Gal-exprimierenden *ex tumore*-A20-*lacZ*-Zellklone im Tier untersucht. Es zeigte sich ein ausgeprägter Hepatotropismus in Übereinstimmung mit der Rationale unseres Vorgehens. Unterschiede bestanden jedoch in der Tumorigenität der einzelnen Klone. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Tumorigenität und  $\beta$ -Gal-Expression nicht korreliert waren.

Der Klon E12E wurde für alle folgenden Untersuchungen ausgewählt, da er gleichzeitig die stärkste  $\beta$ -Gal-Expression und die höchste Tumorigenität von allen Klonen aufwies.

Im Gegensatz zur Parentalzelllinie A20 wurde die Pathogenität des Leber-infiltrierenden Klons E12E nicht signifikant durch die hämatopoetische Rekonstitution beeinflusst. Das verringerte Tumorstadium und die dadurch bedingte verringerte Pathogenität der A20-Zellen gegenüber den E12E-Zellen ist im Zusammenhang mit der Immunogenität zu sehen. Ein Grund dafür, dass der Leber-adaptierte E12E-Klon nur schwach immunogen zu sein scheint, ist sicherlich die Tatsache, dass die Leber ein stark tolerogenes Organ ist (Bumgardner et al., 1998 und Knolle & Gerken, 2000). Die immunhistologische Analyse von Lebern, die Tumorfoci aufwiesen, zeigte eine hohe Zahl infiltrierender T-Zellen, die jedoch keinen erkennbaren Einfluß auf die Tumorentwicklung hatten. Eine funktionelle Analyse dieser „Observer“-T-Zellen steht noch aus.

### **Charakteristika des Tumorstadiums im KMT-Modell**

Bei i. v. Gabe von A20-Zellen kam es in immunsupprimierten Tieren in vielen Organen wie Lunge, Milz, Leber, Ovarien, Darm und vor allem der Bereich des Retroperitoneums (Nieren, Rückenmuskulatur und –mark) zur Tumorbildung. Im Gehirn, der Speicheldrüse und im Herz entwickelten sich keine Tumoren. Alle Tiere verstarben innerhalb von 3 Wochen. In Abwesenheit einer Immunkontrolle erwies sich das A20-Lymphom somit als hoch pathogen.

Die Tumorzelldosis, die nötig war, um nach Rekonstitution durch KMT eine Tumorbildung auszulösen, lag bei  $10^6$  A20-Zellen. Schon eine 10fach geringere Dosis führte nicht zur Letalität. Daraus ergibt sich, dass die Parentalzelle A20 stark immunogen und nur wenig tumorigen zu sein scheint.

Die Situation stellte sich bei dem ausgewählten A20-Subklon E12E völlig anders dar. Zellen dieses Klons siedelten sich primär in der Leber der Tiere (Hepatotropismus) an. Es kam nur zu sehr späten Zeitpunkten nach Tumorgabe zu einer Metastasierung des Tumors in die Bauchhöhle, die nicht mit der Metastasierung des A20-Tumors vergleichbar ist. Außerdem ist der A20/lacZ-Klon E12E viel stärker tumorigen als die Parentalzelllinie. Die Gabe von  $10^4$  E12E-Zellen führte innerhalb von 8 Wochen zu Tumoren bei etwa 5% der Tiere. In nicht infizierten BALB/c-Rezipienten besiedelte E12E die Leber nach 7 Tagen, und progredierte innerhalb eines Monats zu ausgedehnten Tumorkolonien. Im Vergleich mit der Parentalzelllinie war das Tumorwachstum in der Leber also stärker.

### **Einfluss einer mCMV-Infektion auf das Tumorwachstum des E12E-Subklons**

Die Tumorentwicklung nach Applikation von A20- oder E12E-Zellen wurde im Vergleich von nicht infizierten mit infizierten Tieren analysiert. Die Gabe von A20- oder E12E-Zellen mit paralleler mCMV-Infektion führte zu einer deutlichen Verringerung der Tumorbesiedelung und einer deutlichen zeitlichen Verzögerung des Tumorwachstums in der Leber. Diese Daten belegen eine bisher unbekannte Funktion von CMV.

Wurden immunkompetente, gesunde Tiere, bei denen keine Bestrahlung erfolgte, mit einer ca. 50% letalen Tumorzelldosis belastet, war eine anschließende Infektion dieser Tiere vollständig kurativ.

Anders verhielt es sich bei temporär immundefizienten KM-transplantierten Tieren: hier kam es innerhalb der ersten Wochen zur Entwicklung einer massiven Tumorerkrankung der Tiere und sie erlagen dem Tumor, bereits zwischen der 4. und der 6. Woche. Wurden die Tiere parallel mit mCMV infiziert, so entwickelte sich der Tumor interessanterweise erst nach einer Verzögerung von ca. 4 bis 5 Wochen. Diese Tiere starben erst zwischen der 8. und 10. Woche bei  $10^6$  E12E-Zellen nach 7 Gy Bestrahlung und KMT. Je weniger Tumorzellen gegeben wurden, desto wahrscheinlicher war es, dass das Virus das Tumorwachstum verhindern konnte bzw. das Ansiedeln der Tumorzellen in den Tieren inhibiert wurde. Die meisten der Versuche wurden mit einer sehr hohen initialen Tumorzellzahl durchgeführt. Wurden stattdessen nur wenig Tumorzellen ( $10^4$  E12E/Tier) gegeben, war die Dauer bis zur Entwicklung massiver Tumoren in der Leber deutlich länger. Etwa zwei Drittel der

infizierten Tiere entwickelte während des gesamten Untersuchungszeitraumes von bis zu einem Jahr gar keinen Tumor.

Der antitumorale Effekt des Virus ist von der hämatopoetischen Rekonstitution durch KMT unabhängig. Mit anderen Worten funktioniert der CMV-Effekt auch ohne KMT. Bereits am siebten Tag nach hämatoablativer  $\gamma$ -Bestrahlung war der beobachtete Effekt in Rezipienten mit KM-Aplasie und Panleukozytopenie wirksam. Zu diesem frühen Zeitpunkt waren schon zahlreiche kleinste Tumorkolonien in den nicht infizierten Tieren sichtbar, die im Verlaufe der folgenden Tage deutlich progredierte. Demgegenüber traten Tumoren in infizierten Tieren nur vereinzelt auf und waren meistens erst ab der dritten Woche nachweisbar.

Unter den gewählten Bedingungen (ohne KMT) war die mCMV-Infektion im Organismus nicht mehr kontrollierbar und führte innerhalb von 12 bis 18 Tagen zum Tod der Tiere. Somit erwies sich die Auswertung zwischen den Tagen 10 und 12 nach Behandlung daher als ein guter Kompromiss, da die Tumorzellen bzw. Tumorkolonien auch zu sehr frühen Zeitpunkten gut in immunhistochemisch gefärbten Leberschnitten ausgezählt werden können.

### **TNF- $\alpha$ und andere Zytokine als mögliche Mediatoren des antitumoralen Effektes**

TNF-alpha gehört zur Klasse der Zytokine und wird vorwiegend von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet (Carswell et al., 1975). Es ist nicht glykosyliert und besteht aus drei identischen Polypeptidketten von jeweils 157 Aminosäuren. Zwischen den Aminosäuren Cystein<sub>69</sub> (beim Menschen, bei der Maus Cystein<sub>71</sub>) und Cystein<sub>101</sub> befindet sich eine Disulfidbrücke. Jede Polypeptidkette hat ein Molekulargewicht von 17,35 kDa (Beutler & Cerami, 1986).

Die Bedeutung von TNF-alpha innerhalb des Immunsystems ist in seiner zentralen regulatorischen Rolle bei Entzündungs- und Immunreaktionen und in seiner antitumoralen Wirkung zu sehen. Es wird zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entzündung gebildet und löst eine verstärkte Freisetzung von Plasmaproteinen und eine vermehrte Wanderung von Phagozyten und Lymphozyten ins Gewebe aus.

Dieses Zytokin wird therapeutisch eingesetzt, um Weichteilsarkome der Extremitäten zu behandeln. Die Wirkung besteht in einer Schrumpfung der Tumoren, welche die anschließende operative Entfernung begünstigt (Eggermont & Hagen, 2001).

Viele Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche TNF-Rezeptoren. Durch die Bindung von TNF-alpha an diese Rezeptoren werden eine Reihe spezifischer

Signaltransduktionsprozesse ausgelöst, die je nach Zelltyp zu bestimmten Zellantworten führen. Eine davon ist die Beeinträchtigung des Tumorwachstums durch die Veränderung der Bildung von Oberflächenproteinen u. a. von solchen, die die Bindung an andere Zellen sowie die Produktion von Wachstumsfaktoren bewirken. Hierzu zeigten Leibovich et al. (1987), dass TNF-alpha einerseits das Tumorwachstum durch die Gefäßneubildung (Neoangiogenese) fördert, andererseits eine direkte zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen hat. TNF-alpha schädigt auch die Gefäße von Tumoren, so dass mikroskopisch kleine Thrombosen entstehen und Immunzellen in den Tumor eindringen können (Terlikowski et al., 1997).

Wir haben das Zytokin TNF-alpha auf seine Tumor-inhibierende Wirkung, die bereits früher beschrieben wurde (Terlikowski et al., 2001; Terlikowski et al., 2002), getestet. Dazu wurden immunsupprimierten Tieren E12E-Zellen i. v. appliziert. Optional wurden die Rezipienten mit mCMV infiziert. Ein Teil der nicht infizierten Tiere erhielt zusätzlich TNF-alpha, um die eventuell durch die mCMV-Infektion ausgelöste TNF-alpha-Produktion zu imitieren. Andere Tiere, die infiziert wurden, bekamen zudem noch Antikörper gegen TNF-alpha, um den antitumoralen Effekt wieder aufzuheben. Beide Ansätze zeigten jedoch, dass TNF-alpha nicht für den antitumoralen Effekt durch mCMV verantwortlich ist.

Es ist bekannt, dass die mCMV-Infektion zu einer Erhöhung der Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, TNF und IFN- $\gamma$  im Serum führt (Ruzek et al., 1997). Für IL-12 konnte z. B. eine antitumorale Wirkung gegen verschiedene Maustumoren des hämatopoetischen Systems gezeigt werden (Gautam et al., 2000).

So könnten im Serum infizierter Tiere unseres Modells Faktoren enthalten sein, die den beobachteten antitumoralen Effekt vermitteln. Deshalb wurde immunsupprimierten Mäusen, die Tumorzellen erhalten hatten, das entsprechende Serum intravenös injiziert. Es kam in diesen Tieren allerdings nicht zur Kontrolle des Tumors.

Auch die Inkubation der E12E-Zellen in diesem Serum, bevor diese den Tieren appliziert wurden, hatte keinen inhibierenden Einfluss auf das Tumorwachstum.

Letztlich hatte auch die Kultivierung von E12E-Zellen mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen aus infizierten Tieren keine negative Auswirkung auf ihr Wachstum.

Daraus läßt sich schließen, dass von Bestandteilen des Serums keine antitumorale Wirkung ausgeht.

## **Einfluss von mCMV auf die E12E-Zellen**

Es ist seit langem bekannt, dass Viren Tumorzellen infizieren und lysieren können. Solche Viren nennt man onkolytische Viren. Beispiele für derartige Viren oder Virusvarianten sind: das Newcastle Disease Virus, das Vesikuläre Stomatitis Virus, Parvoviren und Adenoviren.

Ein weiteres Beispiel für Anti-Krebs-Viren sind Reoviren. Sie replizieren sehr schnell und sind für den Menschen apathogen. Bekannt ist, dass Reoviren nur Zellen infizieren, die Salinsäuremoleküle auf der Oberfläche tragen. Der Virologe *Patrick Lee* entdeckte, dass jedoch noch weitere Faktoren für die Virusreplikation notwendig sind: unter anderem das *ras*-Protein (Coffey et al., 1998). Dieses *ras*-Protein blockiert ein 65kDa-Phosphoprotein, das sonst die Virussyntese in der Zelle verhindern würde. *Ras* ist ein bekanntes Onkogen, dessen Aktivierung zur Proliferation von ruhenden Zellen führt, wodurch Tumore entstehen und das in zahlreichen Krebsarten überexprimiert wird. Es zeigte sich, dass Reoviren *ras*-exprimierende Zellen besonders gut infizieren. Nach der Gabe von humanen Glioblastomzellen in immundefiziente Mäuse und dem anschließenden Applikation von Reoviren kam es in 65-80% der Mäuse zur Tumorremission (Coffey et al., 1998).

Neben diesen potentiell „onkolytischen Viren“ wird in verschiedenen Laboratorien daran gearbeitet, auch andere Viren so zu verändern, dass sie Krebszellen gegenüber Strahlen- oder Chemotherapie empfindlicher machen (Bischoff et al., 1996; Pensini, 1998).

Eines dieser gentechnisch veränderten onkolytischen Viren ist das Adenovirus „ONYX-015“. Um replizieren zu können, blockieren Adenoviren p53 in ihren Wirtszellen. Durch eine Deaktivierung des Blockade-Gens, kann sich ONYX-015 nur in Zellen vermehren, in denen p53 abgeschaltet ist – z. B. in Krebszellen. So zeigten die Versuche in Nagetieren, dass ONYX-015 tatsächlich Krebszellen auslöscht, ohne gesunde Zellen anzugreifen (Bischoff et al., 1996 und Heise et al., 1997). Mittlerweile hat ONYX-015 die klinischen Testphasen I bis III erfolgreich bestanden (Heise et al., 1999; Khuri et al., 2000).

Die wichtigste Frage für uns war nun, ob die A20-Parentalzelllinie oder die E12E-Linie durch mCMV infizierbar ist. Es zeigte sich, dass in unserem Modellsystem weder die A20-Parentalzelllinie noch die E12E-Zellen durch mCMV infiziert werden konnten. Dies konnte *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden. Weder die Zugabe von mCMV zu dem E12E-Lymphom in Zellkultur, noch die immunhistologische Doppelfärbung für das IE1-Protein und das B-Zell-Antigen zeigten einen Hinweis dafür, dass die Tumorzellen infizierbar sind. Ebenso konnte keine Korrelation

zwischen dem Grad der Infektion eines Organs und der Tumorlast in den Tieren gefunden werden.

Ferner wurde in Tumorzellen in direkter Nachbarschaft zu infizierten Hepatozyten keine Apoptose ausgelöst. Die aktive proapoptotische Caspase-3 war in diesen Tumorzellen nicht nachweisbar. Gleichzeitig war auch die Proliferation der betrachteten Tumorzellen nicht eingeschränkt, was durch immunhistologische PCNA-Färbungen gezeigt werden konnte. Bestätigt wurde dies dadurch, dass in vielen Tumorfoci Mitosestadien sich gerader teilender Zellen detektiert wurden.

Obwohl Cytomegaloviren viele verschiedene Zelltypen *in vivo* infizieren können (Ibanez et al., 1991; Sinzger et al., 1996; Plachter et al., 1996; Podlech et al., 1998; Hanson et al., 1999 und Andrews et al., 2001), sind nicht alle Zelltypen von einer mCMV-Infektion betroffen. Beispielsweise Lymphozyten werden nicht durch mCMV infiziert (Podlech, persönliche Mitteilung), und es sind bisher auch keine Fälle bekannt, in denen mCMV onkolytisch auf Tumorzellen wirkt. Der antitumorale Effekt wird also nicht durch die mCMV-Infektion *per se* ausgelöst.

Um den Einfluss der CMV-Erkrankung auf den Tumor zu untersuchen, wurden Mäuse nach Immunsuppression, Infektion und Tumorgabe einer präemptiven antiviralen Therapie unterzogen. Sie erhielten zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), die spezifisch für das mCMV-IE1-Peptid mit der Sequenz YPHFMPTNL sind (Holtappels et al., 2002). Diese IE1-CTL verhinderten die mCMV-Erkrankung der Tiere nahezu vollständig. Das überraschende Ergebnis, dass durch eine antivirale mCMV-Therapie mittels IE1-spezifischen CTL der antitumorale Mechanismus nicht beeinflusst wird, lässt den Schluss zu, dass die Leberinfektion nicht der Grund für die Tumordinhibition ist. Diese interessante Beobachtung erlaubt eine deutliche Unterscheidung und Trennung zwischen dem Anti-Tumor-Effekt und den pathogenen Folgen der Gabe von infektiösem Virus, nämlich der Infektion und gegebenenfalls der Entzündungsreaktion.

### **Applikation von nicht-replikativem Virus**

Die Inaktivierung des Virus durch UV-Licht und seine anschließende Gabe im Tierversuch sollte aufklären, inwieweit replikatives Virus für den antitumoralen Effekt notwendig ist. Die UV-Bestrahlung von Virus führt zu Schädigungen der Virus-DNA. In der Folge ist das „UV“-Virus nicht mehr replikationsfähig. Die intraplantare Gabe von mCMV<sup>UV</sup> führte zu keinem antitumoralen Effekt, jedoch die intravenöse Applikation. Die Unwirksamkeit nach intraplantarer Gabe beruht möglicherweise

darauf, dass inaktiviertes Virus nicht hämatogen disseminiert und somit den Wirkort Leber nicht erreichen kann. Infektiöses Virus jedoch erreicht nach subkutaner Infektion durch die Virämie die Leber. Der Anti-Tumoreffekt ist also tatsächlich unabhängig von Infektion und Entzündung.

### **Gestörte Extravasation der Tumorzellen**

Murines CMV wirkt bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt, am Tag 7 nach Infektion und Tumorgabe, antitumoral. Aus diesem Grund vermuteten wir als wahrscheinlichsten Mechanismus eine Inhibition der Extravasation (transendotheliale Migration/Diapedese) der Tumorzellen aufgrund einer gestörten Kommunikation zwischen Tumorzelle und sinusoidalem Endothel der Leber (Nicolson et al., 1989; Honn & Tang, 1992; Chambers et al., 1995; Incardona et al., 1995; Hangan et al., 1997; Yoon et al., 2003). Hierfür könnte eine gestörte Interaktion zwischen Tumorzelle und dem Endothel beim Prozess der Anheftung oder Migration der Tumorzellen verantwortlich sein. Denkbar wäre, dass das *Triggering* oder die Adhäsion durch eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen/Selektinen und Integrinen, aber auch die frühe Angiogenese beeinträchtigt sind. Den entscheidenden Hinweis dafür zeigte das Experiment, in welchem der antitumorale Effekt durch nicht replikatives Virus auslösbar war. Die UV-Bestrahlung des Virus führt nicht zu einer Zerstörung der Virionproteine, die somit als Induktoren für den antitumoralen Effekt verantwortlich sein könnten. So wollen wir in Zukunft die zellulären und molekularen Mechanismen aufklären, über die das Virus die transendotheliale Zell-Migration inhibiert. Dies erfordert die Identifizierung des viralen Liganden, der diesen Effekt induziert und die Aufklärung der zu diesem Effekt führenden molekularen Prozesse der Endothelzelle auf das virale Signal.

Die Bindung von CMV an die Zielzellen der Infektion erfolgt über die Hüllglykoproteine. Für den Effekt könnten aber auch Tegument- und/oder Kapsidproteine wichtig sein. Es ist jedoch naheliegender, dass eines der Virion-Hüllglykoproteine (gB, gO, GH, gM, gL, UL4-gp48) bzw. deren Komplexe gCI (gB), gCII (gM) und gCIII (gH, gL, gO) als Auslöser in Frage kommen. Mit Ausnahme von gO und UL4-gp48 sind in hCMV alle Hüllglykoproteine essentiell für Infektiosität (Hobom et al., 2000). Eine besonders wichtige Rolle spielt das Hüllglykoprotein gB. Das Gen M55 von mCMV kodiert für das Hüllglykoprotein gB, das Homologon zu UL55-gB von hCMV. Für mCMV konnte dies bisher noch nicht gezeigt werden.

Aufgrund der Homologie der beiden Viren ist aber ein ähnliches Resultat anzunehmen (Chou & Marousek, 1992; Rapp et al., 1992).

### **Durch mCMV ausgelöster *Shut the door*-Mechanismus**

Dieses Projekt besitzt noch weiterreichende Implikationen. Eventuell führt dieser Mechanismus dazu, dass nach Virusdissemination in ein Zielorgan auch antivirale Immunzellen an der Extravasation/Gewebeinfiltration und damit an der Ausübung ihrer antiviralen Effektorfunktionen gehindert werden.

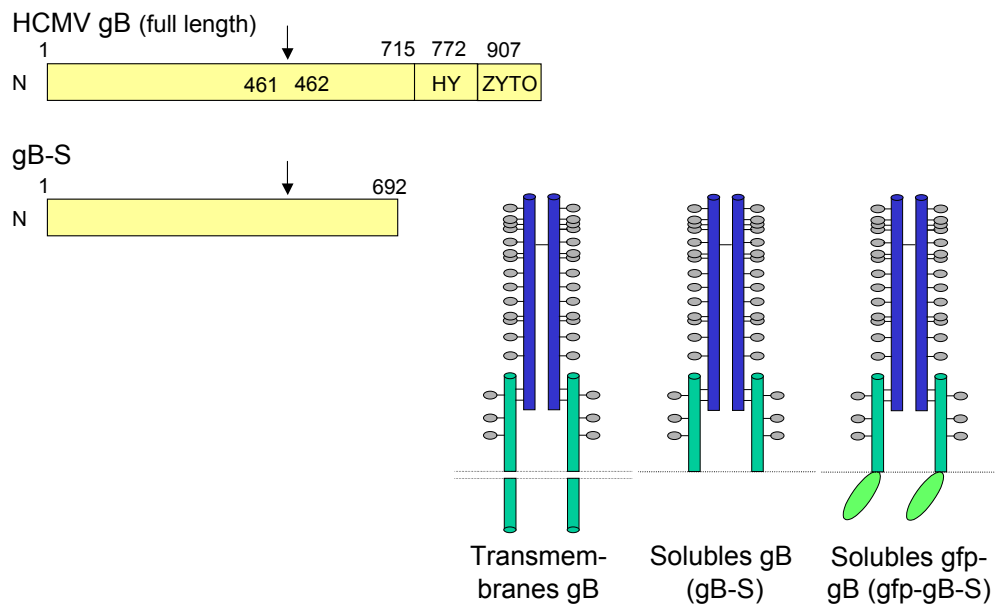
Es könnte sich dabei um einen generellen *Shut the door*-Mechanismus des Virus handeln. Somit würde die antivirale Immunkontrolle in Zielorganen der Infektion zumindest zeitweise aufgehalten werden.

Es stellt sich schließlich die Frage, ob der Effekt wirklich genereller Natur ist; ob er also auch Leukämiezellen anderer Differenzierungslinien und vielleicht auch normale Leukozyten betrifft.

### **Ausblick**

Wir wollen andere Tumorzelllinien in unserem murinen Modellsystem untersuchen. Als nächstes wollen wir ein T-Zell-Lymphom, welches wir von der Arbeitsgruppe von Prof. V. Schirmacher (DKFZ, Heidelberg) erhalten haben, analysieren. Diese Linie wird uns ermöglichen, zu testen, ob der virale Effekt nur am sinusoidalen Endothel der Leber wirksam ist, oder ob auch die Extravasation von Tumorzellen an anderen Endothelien inhibiert wird.

In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Bindung von hCMV-gB an seinen zellulären (noch nicht endgültig identifizierten) Rezeptor zu einer umfassenden Modulation der zellulären Transkription führt. Interessanterweise waren Gene betroffen, die bekanntermaßen auch durch Interferone stimuliert werden (*Interferon Stimulated Genes, ISGs*) (Zhu et al., 1998; Boyle et al., 1999; Simmen et al., 2001). Wenn ISG in den Effekt involviert sind, dann sollte dieser mit rekombinanten IFN induziert werden können. Da wir aber erwarten, dass die Stimulation über den alternativen Weg der gB Bindung erfolgt, sollten anti-IFN-Ak den Effekt von UV-inaktiviertem Virus nicht inhibieren. Jedoch existieren derzeit für mCMV keine neutralisierenden anti-gB-Antikörper.



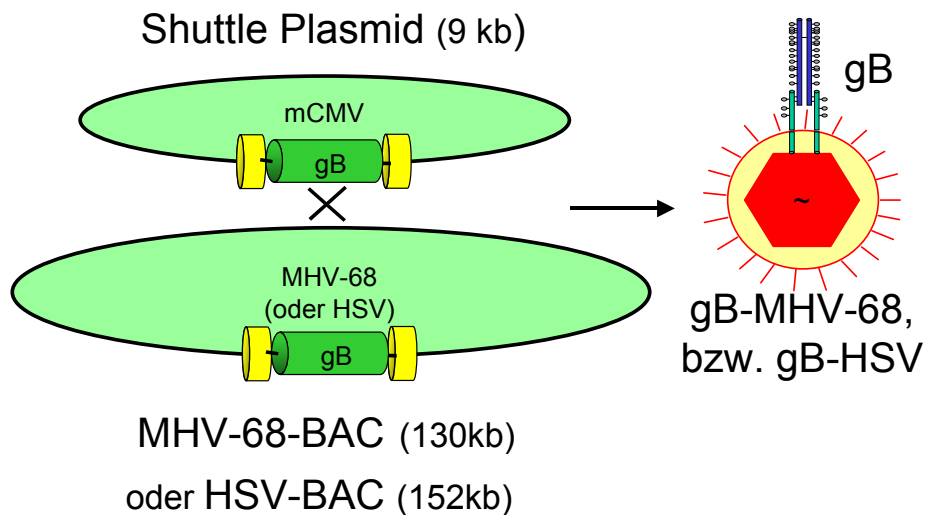
**Abbildung 37: Schematische Darstellung des Glykoprotein B von hCMV.**

Genomische Anordnung des Glykoprotein B (HY = Hydrophobe Domäne; ZYTO = zytoplasmatische Domäne). Mögliche Modifikationen des gB (transmembranes, solubles +/- gfp (*green fluorescent protein*)).

Die gB aller Herpesviren besitzen untereinander eine verschieden stark ausgeprägte Strukturhomologie. Es ist somit nicht auszuschließen, dass das gB unterschiedlicher Herpesviren den Effekt auslösen kann. In Zukunft werden wir testen, ob hCMV (und andere Herpesviren) ebenfalls den antitumoralen Effekt aufweisen. Sollte hCMV dies tun, steht aus der Arbeitsgruppe von Theresa Compton (Universität Wisconsin) gereinigtes, solubles gB zur Testung zur Verfügung (siehe Abb. 37). Des Weiteren könnte gfp (*green fluorescent protein*) als Reporteranteil an das lösliche gB gekoppelt werden und in Mäuse appliziert werden. Außerdem könnten nicht infektiöse subvirale Partikel, so genannte *Dense Bodies* die gB in ihrer Hülle tragen, zur Auslösung des Effektes eingesetzt werden (Arbeitsgruppe B. Plachter an unserem Institut).

Solubles gB (gewonnen durch Überexpression in Baculovirus-Systemen und nachfolgender immunaffinitäts-chromatographischer Reinigung) wirkt zwar *in vitro* signalinduzierend; eine mögliche antitumorale Wirksamkeit in unserem Modell ist aber nicht eindeutig erudierbar, weil gB eventuell nur im Kontext mit einer Membran den antitumoralen Effekt auszulösen vermag. So planen wir die Herstellung von Herpesviren, deren gB durch mCMV-gB ausgetauscht werden soll. In Frage kommen Austauschmutanten basierend auf dem  $\alpha$ -Herpesvirus HSV und dem  $\gamma$ -Herpesvirus MHV-68 (Abb. 38). Jedoch dürfen HSV und MHV-68 selbst keinen

antitumoralen Effekt besitzen. Das gB von MHV-68 zeigt 53,8% Homologie zum mCMV-gB (Virgin et al., 1997; Rawlinson et al., 1996). Aus einer Kooperation steht uns ein MHV-68 BAC-Klon für die Mutagenese zur Verfügung (Adler et al., 2000).

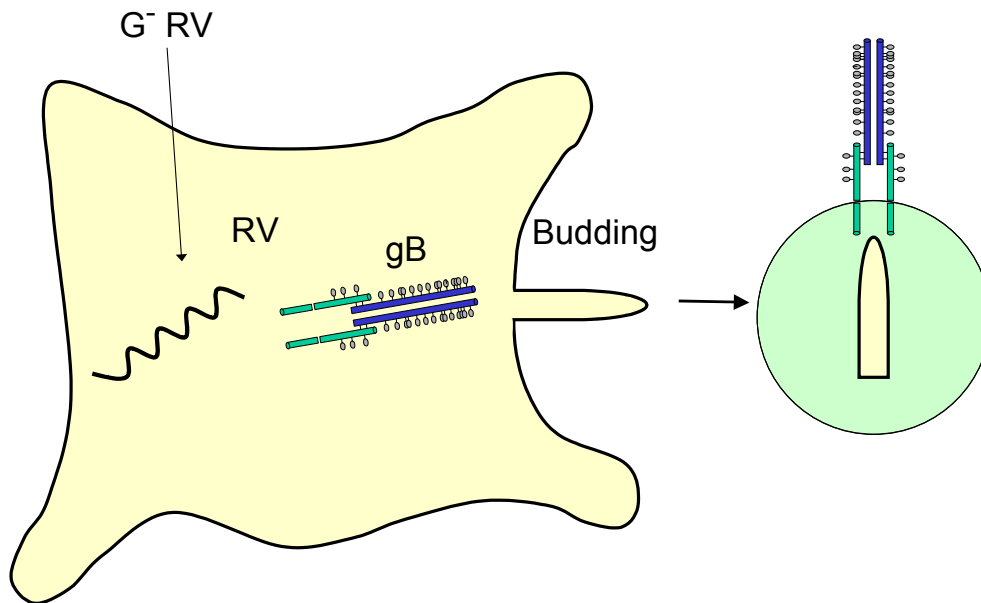


**Abbildung 38: Klonierungsstrategie für das MHV-68-gB-BAC bzw. HSV-gB-BAC.**

Erläuterungen zur Klonierung erfolgen lediglich für das MHV-68-System: Klonierung von MHV-86 ORF 8 (gB) mit ca. 2kb symmetrisch flankierenden Bereichen in Shuttle-Plasmid pST76K\_SR, gefolgt von einem Austausch des ORF 8 durch mCMV ORF M55 (gB). Anschließende Transformation des Shuttle-Plasmids in DH 10B (recA negative *E. coli*), die bereits stabil das MHV-68 Genom als BAC tragen. Homologe Rekombination, gefolgt von Selektion auf rekombinante BAC-Plasmide. Isolierung der rekombinanten BAC DNA und Transfektion in BHK-21-Zellen. Letztlich Plaquereinigung, Virusproduktion und Virusreinigung.

Vorraussetzung für die Herstellung von herpesviralen gB-Austauschmutanten ist, dass mCMV-gB die Morphogenese der rekombinanten MHV-68 Virionen unterstützt. Ein alternativer Ansatz ist deshalb die Herstellung von Rabies-Virus-Pseudotypen, die in ihrer Hülle mCMV-Glykoproteine tragen. Diese Virus-Pseudotypen würden dann selektiv mCMV gB, im Bedarfsfall auch andere mCMV Hüllglykoproteine, auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Das Rabies Virus (RV) ist ein umhülltes Minus-Strang RNA-Virus, es gehört zur Familie der Rhabdoviridae (Genus Lyssa-Virus).



**Abbildung 39: Generierung von RV-mCMV-gB-Pseudotypen.**

Generierung eines Expressionsvektors für das Hybridglykoprotein: *in frame* Klonierung eines mCMV M55 PCR Fragments in einen T7/EMCV IRES Expressionsvektor, der bereits die kodierenden Sequenzen für den zytoplasmatischen RV-G Anker enthält. Transfektion des Expressionsplasmids in VVT7-Zellen. Kontrolle der Oberflächenexpression von mCMV-gB durch Immunfluoreszenz mit monoklonalen Ak gegen mCMV-gB. Generierung der Pseudovirionen durch Trans-Komplementierung.

Die Rabies-Virus-Pseudotypen tragen anstelle ihres einzigen Glykoproteins G ein Hybridmolekül aus dem HIV Env und der zytoplasmatischen Domäne von RV-G in der Hülle. Das RV-G ist für ihre Morphogenese nicht essentiell (Mebatsion & Conzelmann, 1996). In einer Kooperation mit Prof. Dr. K. Conzelmann könnten wir diese RV-mCMV-gB-Pseudotypen herstellen.

## 5 Literatur

**Adler, H.**, Martin Messerle, Markus Wagner, and Ulrich H. Koszinowski (2000). Cloning and Mutagenesis of the Murine Gammaherpesvirus 68 Genome as an Infectious Bacterial Artificial Chromosome. *J. Virol.* 2000 74: 6964-6974.

**Alberts, B.**, Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1997). Zellverbindungen Zell/Zell-Adhäsion und die extrazelluläre Matrix. In: Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.; übersetzt von Jaenicke, L. (Hrsg.): *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage, VCH, Weinheim, NY, Basel usw., 1997, S. 1156-1175.

**Albrecht, T.**, Nachtigal, M., St Jeor, S., Rapp, F. (1976). Induction of cellular DNA synthesis and increased mitotic activity in syrian hamster embryo cells abortively infected with human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 1976 Feb; 30(2): 167-77.

**Allavena, P.**, Paganin, C., Martin-Padura, I., Peri, G., Gaboli, M., Dejana, E., Marchisio, P. C., Mantovani, A. (1991). Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J Exp Med* 1991 Feb 1; 173(2): 439-48.

**Andrews, D. M.**, Andoniou, C. E., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P., Degli-Esposti, M. A. (2001). Infection of dendritic cells by murine Cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat Immunol.* 2001 Nov; 2(11): 1077-84.

**Basgoz, N.**, Qadri, I., Navarro, D., Sears, A., Lennette, E., Youngblom, J., Pereira, L. (1992). The amino terminus of human Cytomegalovirus glycoprotein B contains epitopes that vary among strains. *J Gen Virol.* 1992 Apr; 73 ( Pt 4): 983-8.

**Bedford, J. S. & Mitchell, J. B.** (1974). The effect of hypoxia on the growth and radiation response of mammalian cells in culture. *Br J Radiol* 1974 Oct; 47(562): 687-96.

**Beutler, B. & Cerami, A.** (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986 Apr 17-23; 320(6063): 584-8.

**Bischoff, J. R.**, D. H. Kirn , A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A . Sampson-Johannes, A. Fattaey, F. McCormick (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 274: 373-376.

**Boppana, S. B.**, Rivera, L. B., Fowler, K. B., Mach, M., Britt, W. J. (2001). Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 2001 May 3; 344(18): 1366-71.

**Bouck, N.**, Stellmach, V., Hsu, S. C. (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69: 135-74.

- Boyle, K. A.,** Pietropaolo, R. L., Compton, T. (1999). Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human Cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol Cell Biol.* 1999 May; 19(5):3607-13.
- Britt, W. J. & Alford, C. A.** Cytomegalovirus. In: *Field's Virology Vol. 2*, 3rd edn. (Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds). Philadelphia: Lippincott-Raven 1996; pp. 2493-2523.
- Britt, W. J. & Mach, M.** (1996). Human Cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology.* 1996; 39(5-6):401-12. Review.
- Britt, W. J. & Vugler L. G.** (1992). Oligomerization of the human Cytomegalovirus major envelope glycoprotein complex gB (gp55-116). *J Virol.* 1992 Nov; 66(11): 6747-54.
- Bryant-Greenwood, G. D.** (1998). The extracellular matrix of the human fetal membranes: structure and function. *Placenta* 1998 Jan; 19(1): 1-11.
- Bumgardner, G. L.,** J. Li, M. Heininger, R. M. Ferguson, C. G. Orosz (1998). In vivo immunogenicity of purified allogeneic hepatocytes in a murine hepatocyte transplant model. *Transplantation* 15; 65(1): 47-52.
- Carswell, E. A.,** Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975 Sep; 72(9): 3666-70.
- Chambers, A. F.,** MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Koop, S., Morris, V. L., Khokha, R., Groom, A. C. (1995). Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev* 1995 Dec;14(4):279-301
- Chong, K. T. & Mims, C. A.** (1981). Murine Cytomegalovirus particle types in relation to sources of virus and pathogenicity. *J Gen Virol* 1981 Dec; 57(Pt 2):415-9.
- Chou, S. & Marousek G. I.** (1992). Homology of the envelope glycoprotein B of human herpesvirus-6 and Cytomegalovirus. *Virology.* 1992 Nov; 191(1): 523-8.
- Coffey, M. C.,** Strong, J. E., Forsyth, P. A., Lee, P. W. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 1998 Nov 13; 282(5392): 1332-4.
- Cranage, M. P.,** Smith, G.L., Bell, S. E., Hart, H., Brown, C., Bankier, A. T., Tomlinson, P., Barrell, B. G., minson, T. C. (1988). Identification and expression of a human Cytomegalovirus glycoprotein with homology to the Epstein-Barr virus BXLF2 product, varicella-zoster virus gpIII, and herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Virol.* 1988 Apr; 62(4): 1416-22.
- Eggermont, A. M. & Hagen, T. L.** (2001). Isolated limb perfusion for extremity soft-tissue sarcomas, in-transit metastases, and other unresectable tumors: credits, debits, and future perspectives. *Curr Oncol Rep* 2001 Jul; 3(4): 359-67.
- Eichbichler, A.** (2001). Induktion von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) durch Thrombin in der Osteosarkomzelllinie U2-OS. Dissertation. Medizin der Technischen Universität München.

- Eickmann, M.**, Lange, R., Ohlin, M., Reschke, M. und Radsak, K. (1998). Effect of cysteine substitutions on dimerization and interfragment linkage of human Cytomegalovirus glycoprotein B (gp UL55). *Arch Virol.* 1998; 143(10): 1865-80.
- Emery, V. C. & Griffiths, P. D.** (1990). Molecular biology of Cytomegalovirus. *Int J Exp Pathol.* 1990 Dec; 71(6): 905-18. Review.
- Enquist, L. W.**, Husak, P. J., Banfield, B. W., Smith, G. A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* 1998; 51: 237-347.
- Erlach, K. C.**, Podlech, J., Rojan, A., Reddehase, M. J. (2002). Tumor control in a model of bone marrow transplantation and acute liver-infiltrating B-cell lymphoma: an unpredicted novel function of Cytomegalovirus. *J Virol.* 2002 Mar; 76(6): 2857-70.
- Etoh, K.**, Tamiya, S., Yamaguchi, K., Okayama, A., Tsubouchi, H., Ideta, T., Mueller, N., Takatsuki, K., Matsuoka, M. (1997). Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res* 1997 Nov 1; 57 (21): 4862-7.
- Farrar, G. H. & Greenaway, P. J.** (1986). Characterization of glycoprotein complexes present in human cytomegalovirus envelopes. *J Gen Virol* 1986 Jul; 67 (Pt 7): 1469-73.
- Fish, K. N.**, Cecilia Söderberg-Nauclér, Lisa K. Mills, Stephan Stenglein, Jay A. Nelson (1998). Human Cytomegalovirus Persistently Infects Aortic Endothelial Cells. *J. Virol.* 1998 72: 5661-5668.
- Fräter-Schröder, M.**, Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., Bohlen, P. (1987). Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Aug;84(15):5277-81.
- Fujiwara, H.**, Eizuru, Y., Matsumoto, T., Kukita, T., Imaizumi, R., Kawada, H., Ohtsubo, H., Matsushita, K., Arima, N., Tei, C. (2001). The significance of Cytomegalovirus infection over the clinical course of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Microbiol Immunol.* 2001; 45(1): 97-100.
- Fujiwara, H.**, Matsumoto, T., Eizuru, Y., Matsushita, K., Ohtsubo, H., Kukita, T., Imaizumi, R., Matsumoto, M., Hidaka, S., Arima, N., Tei, C. (2000). Cytomegalovirus infection is not necessarily a poor prognostic factor in adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Med Virol.* 2000 Oct; 62(2): 140-3.
- Gautam, S. C.**, Xu, Y. X., Dumaguin, M., Janakiraman, N., Chapman, R. A. (2000). Interleukin-12 (IL-12) gene therapy of leukemia: immune and anti-leukemic effects of IL-12-transduced hematopoietic progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2000 Jul; 7(7):1060-8.
- Gershon, A. A.**, Sherman, D. L., Zhu, Z., Gabel, C. A., Ambron, R. T., Gershon, M. D. (1994). Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *J Virol* 1994 Oct; 68(10): 6372-90.

**Gorman, C. M.**, Moffat, L. F., Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1982 Sep; 2(9): 1044-51.

**Granzow, H.**, Weiland, F., Jons, A., Klupp, B. G., Karger, A., Mettenleiter, T. C. (1997). Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J Virol* 1997 Mar; 71(3):2072-82.

**Gretch, D. R.**, Gehrz, R. C., Stinski, M. F. (1988). Characterization of a human cytomegalovirus glycoprotein complex (gcl). *J Gen Virol* 1988 Jun; 69 ( Pt 6): 1205-15.

**Hahn, G.**, Jores, R., Mocarski, E. S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Mar 31; 95(7): 3937-42.

**Hall, P. A.**, Levison, D. A., Woods, A. L., Yu, C. C., Kellock, D. B., Watkins, J. A., Barnes, D. M., Gillett, C. E., Camplejohn, R., Dover, R., et al. (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990 Dec; 162(4): 285-94.

**Hangan, D.**, Morris, V. L., Boeters, L., von Ballestrem, C., Uniyal, S., Chan, B. M. (1997). An epitope on VLA-6 (alpha6beta1) integrin involved in migration but not adhesion is required for extravasation of murine melanoma B16F1 cells in liver. *Cancer Res* 1997 Sep 1; 57(17):3812-7.

**Hanson, L. K.**, Slater, J. S., Karabekian, Z., Virgin, H. W. 4th, Biron, C. A., Ruzek, M. C., van Rooijen, N., Ciavarra, R. P., Stenberg, R. M., Campbell, A. E. (1999). Replication of murine Cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis. *J Virol.* 1999 Jul; 73(7): 5970-80.

**Harari, A.**, Rizzardi, G. P., Ellefsen, K., Ciuffreda, D., Champagne, P., Bart, P. A., Kaufmann, D., Telenti, A., Sahli, R., Tambussi, G., Kaiser, L., Lazzarin, A., Perrin, L., Pantaleo, G. (2002). Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood* 2002 Aug 15; 100(4): 1381-7.

**Heise, C.**, A. Sampson-Johannes, A. Williams, F. McCormick, D. D. Von Hoff, D. H. Kirn (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytotoxicity and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat. Med.* 3: 639-645.

**Heise C.**, A. M. Williams, S. Xue, M. Propst, D. H. Kirn (1999). Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer. Res.* 59: 2623-8.

**Ho, M.** (1995). Cytomegalovirus. In *Principles & Practice of Infectious Diseases*. G. C. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin, eds., New York: Churchill Livingstone. N. Engl. J. Med. 293: 1109-1112.

**Hobom, U.**, Brune, W., Messerle, M., Hahn, G., Koszinowski, U. H. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes:

mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol* 2000 Sep; 74(17): 7720-9.

**Holtappels, R.,** J. Podlech, G. Geginat, H.-P. Steffens, D. Thomas, M. J. Reddehase (1998). Control of murine Cytomegalovirus in the lungs: relative but not absolute immunodominance of the immediate-early 1 nonapeptide during the antiviral cytolytic T-lymphocyte response in pulmonary infiltrates. *J. Virol.* 72: 7201-7212.

**Holtappels, R.,** Thomas, D., Podlech, J., Reddehase, M. J. (2002). Two antigenic peptides from genes m123 and m164 of murine Cytomegalovirus quantitatively dominate CD8 T-cell memory in the H-2d haplotype. *J Virol* 2002 Jan; 76(1): 151-64.

**Honn, K. V. & Tang, D. G.** (1992). Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer Metastasis Rev* 1992 Nov;11(3-4):353-75.

**Huber, M. T. & Compton, T.** (1998). The human Cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *J Virol.* 1998 Oct; 72(10): 8191-7.

**Huber, M. T. & Compton, T.** (1999). Intracellular formation and processing of the heterotrimeric gH-gL-gO (gCIII) glycoprotein envelope complex of human Cytomegalovirus. *J Virol.* 1999 May; 73(5): 3886-92.

**Ibanez, C. E.,** Schrier R, Ghazal P, Wiley C, Nelson JA. (1991). Human Cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol.* 1991 Dec; 65(12): 6581-8.

**Incardona, F.,** Lewalle, J. M., Morandi, V., Lambert, S., Legrand, Y., Foidart, J. M., Legrand, C. (1995). Thrombospondin modulates human breast adenocarcinoma cell adhesion to human vascular endothelial cells. *Cancer Res* 1995 Jan 1;55(1):166-73.

**Jäättelä, M.** (1991). Biology of disease. Biologic activities and mechanisms of action of TNF-alpha/catechin. *Lab. Investig.* 64: 724-742.

**Jacobson, M. A. & Brecht, B. M.** (2002). Association of cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ T lymphocyte reactivity and protective immunity against acquired immunodeficiency syndrome-related CMV retinitis. *J Infect Dis* 2002 Dec 1; 186(11): 1701-2; author reply 1702-3.

**Johnson, D. C. & Hill, A. B.** (1998). Herpesvirus evasion of the immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 232: 149-77.

**Kari, B. & Gehrz, R.** (1993). Structure, composition and heparin binding properties of a human Cytomegalovirus glycoprotein complex designated gC-II. *J Gen Virol.* 1993 Feb; 74 ( Pt 2): 255-64.

**Kaye, J. F.,** Gompels, U. A., Minson, A. C. (1992). Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *J. Gen. Virol.* 1992 73: 2693-2698.

**Khuri, F. R.**, J. Nemunaitis, I. Ganly, J. Arseneau, I. F. Tannock, L. Romel, M. Gore, J. Ironside, R. H. MacDougall, C. Heise, B. Randlev, A. M. Gillenwater, P. Bruso, S. B. Kaye, W. K. Hong, and D. H. Kirn (2000). A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat. Med.* 6: 862-863.

**Kiesenbauer, N. P.** (2002). In vitro-Untersuchungen zur Regulation des Wachstums und der Invasivität des Ovarialkarzinoms unter besonderer Berücksichtigung der Rolle von humanem Choriongonadotropin (hCG) und Prostaglandinen. Dissertation. Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

**Kim, K. J.**, Kanellopoulos-Langevin, C., Merwin, R. M., Sachs, D. H., Asofsky, R. (1979). Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* 1979 Feb; 122(2): 549-54

**Knolle, P. A. & G. Gerken** (2000). Local control of the immune response in the liver. *Immunol. Rev.* 174: 21-34.

**Koszinowski, U. H.**, Del Val, M., Reddehase, M. J. (1990). Cellular and molecular basis of the protective immune response to Cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990; 154: 189-220. Review.

**Kouzarides, T.**, Bankier, A. T., Satchwell, S. C., Weston, K., Tomlinson, P., Barrell, B. G. (1987). Sequence and transcription analysis of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene. *J Virol* 1987 Jan; 61(1): 125-33.

**Kruger, A.**, Schirmacher, V., Khokha, R. (1999). The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev.* 1998-99; 17(3): 285-94. Review.

**Kurki, P.**, Ogata, K., Tan, E. M. (1988). Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1988 Apr 22; 109(1): 49-59.

**Kurz, S.**, Steffens, H.-P., Mayer, A., Harris, J.R. & Reddehase, M.J. (1997). Latency versus persistence or intermittent recurrences: evidence for a latent state of murine Cytomegalovirus in the lungs. *J. Virol.* 71: 2980-2987.

**LaFemina, R. L.**, Hayward, G. S. (1983). Replicative forms of human cytomegalovirus DNA with joined termini are found in permissively infected human cells but not in non-permissive Balb/c-3T3 mouse cells. *J Gen Virol* 1983 Feb; 64 (Pt 2): 373-89.

**LaFemina, R.**, Hayward, G. S. (1986). Constitutive and retinoic acid-inducible expression of cytomegalovirus immediate-early genes in human teratocarcinoma cells. *J Virol* 1986 May; 58(2): 434-40.

**Leibovich, S. J.**, Polverini, P. J., Shepard, H. M., Wiseman, D. M., Shively, V., Nuseir, N. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 1987 Oct 15-21; 329(6140): 630-2.

- Liotta, L. A.,** Abe, S., Robey, P. G., Martin, G. R. (1979). Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 May; 76(5): 2268-72.
- Liotta, L. A.,** Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M., Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980 Mar 6; 284(5751): 67-8.
- Liotta, L. A.,** Tryggvason, K., Garbisa, S., Robey, P. G., Abe, S. (1981). Partial purification and characterization of a neutral protease which cleaves type IV collagen. *Biochemistry*, 1981; 20(1); 100-104.
- Mach, M.,** Kropff, B., Dal Monte, P. und Britt, W. (2000). Complex formation by human Cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). *J Virol.* 2000 Dec; 74(24): 11881-92.
- Matrisian, L. M.** (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 1992 Jul; 14(7): 455-63.
- Mayer, A.,** Podlech, J., Kurz, S., Steffens, H. P., Maiberger, S., Thalmeier, K., Angele, P., Dreher, L., Reddehase, M. J. (1997). Bone marrow failure by cytomegalovirus is associated with an in vivo deficiency in the expression of essential stromal hemopoietin genes. *J. Virol.* 1997 71: 4589-4598.
- Mebatsion, T. & Conzelmann, K. K.** (1996). Specific infection of CD4+ target cells by recombinant rabies virus pseudotypes carrying the HIV-1 envelope spike protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Oct 15; 93(21): 11366-70.
- Meyer, G. A. & Radsak, K. D.** (2000). Identification of a novel signal sequence that targets transmembrane proteins to the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem* 2000 Feb 11; 275(6): 3857-66.
- Meyers, J. D.** (1984). Cytomegalovirus infection following marrow transplantation: risk, treatment, and prevention. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1984; 20(1): 101-17.
- Mignatti, P. & Rifkin, D. B.** (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993 Jan; 73(1): 161-95.
- Milne, R. S.,** Paterson, D. A., Booth, J.C. (1998). Human Cytomegalovirus glycoprotein H/glycoprotein L complex modulates fusion-from-without. *J Gen Virol.* 1998 Apr; 79 ( Pt 4): 855-65.
- Montoliu, L.,** Chavez, S., Vidal, M. (2000). Variegation associated with lacZ in transgenic animals: a warning note. *Transgenic Res.* 2000 Jun; 9(3): 237-9.
- Nakajima, M.,** Chop, A. M. (1991). Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzymes: regulation of activity by organ factors. *Semin Cancer Biol* 1991 Apr; 2(2): 115-27.
- Nicolson, G. L.** (1989). Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue. *Curr Opin Cell Biol* 1989 Oct;1(5):1009-19.

- Nolan, G. P.**, Fiering, S., Nicolas, J.F., Herzenberg, L. A. (1988). Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of *Escherichia coli lacZ*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Apr; 85(8): 2603-7.
- Pensini, E.** (1998). Training Viruses to Attack Cancers. *Science*. 282: 1244-1246.
- Plachter, B.**, Sinzger, C., Jahn, G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human Cytomegalovirus. *Adv Virus Res*. 1996; 46: 195-261. Review.
- Podlech, J.**, R. Holtappels, N. Wirtz, H.-P. Steffens, Reddehase, M.J. (1998). Reconstitution of CD8 T cells is essential for the prevention of multiple-organ Cytomegalovirus histopathology after bone marrow transplantation. *J.Gen.Virol*. 79: 2099-2104 .
- Podlech, J.**, R. Holtappels, M.-F. Pahl-Seibert, H.-P. Steffens, M. J. Reddehase (2000). Murine model of interstitial Cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J. Virol*. 74: 7496-7507.
- Price, J.**, Turner, D., Cepko, C. (1987). Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan; 84(1): 156-60.
- Prosch, S.**, Docke, W. D., Reinke, P., Volk, H. D., Kruger, D. H. (1999). Human cytomegalovirus reactivation in bone-marrow-derived granulocyte/monocyte progenitor cells and mature monocytes. *Intervirology* 1999; 42(5-6): 308-13.
- Radich, J. P.** (2000). The detection and significance of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *Medicina (B Aires)* 2000; 60 Suppl 2: 66-70.
- Radsak, K.**, Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A., Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol* 1996; 141(3-4): 557-72.
- Radsak, K.**, Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A., Reschke, M. (1996). Retrieval of human Cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch Virol*. 1996; 141(3-4): 557-72.
- Räth, U.**, Kaufmann, M., Schmid, H., Hofmann, J., Wiedenmann, B., Kist, A., Kempeni, J., Schlick, E., Bastert, G., Kommerell, B., et al. (1991). Effect of intraperitoneal recombinant human tumour necrosis factor alpha on malignant ascites. *Eur J Cancer* 1991; 27(2): 121-5.
- Rapp, M.**, Messerle, M., Buhler, B., Tannheimer, M., Keil, G. M., Koszinowski, U. H. (1992). Identification of the murine Cytomegalovirus glycoprotein B gene and its expression by recombinant vaccinia virus. *J Virol*. 1992 Jul; 66(7): 4399-406.
- Rawlinson, W. D.**, H. E. Farrell und B. G. Barrell (1996). Analysis of the complete DNA sequence of murine Cytomegalovirus. *J. Virol*. 70:541-543.

- Reddehase, M. J.**, Weiland, F., Munch, K., Jonjic, S., Luske, A., Koszinowski, U. H. (1985). Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol* 1985 Aug; 55(2): 264-73
- Reddehase, M. J.**, Fibi, M. R., Keil, G. M., Koszinowski, U. H. (1986a). Late-phase expression of a murine cytomegalovirus immediate-early antigen recognized by cytolytic T lymphocytes. *J Virol* 1986 Dec; 60(3): 1125-9
- Reddehase, M. J.**, Buhring, H. J., Koszinowski, U. H. (1986b). Cloned long-term cytolytic T-lymphocyte line with specificity for an immediate-early membrane antigen of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1986 Jan; 57(1): 408-12.
- Reddehase, M. J.**, Rothbard, J. B., Koszinowski, U. H. (1989). A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* 1989 Feb 16; 337(6208): 651-3.
- Reddehase, M. J.** (1991). Bone marrow dysfunction in irradiated, Cytomegalovirus-infected mice. *Transplantation Proceedings*. 3 Suppl. 23: 8-11.
- Reddehase, M. J.** (2002). Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2002 Nov; 2(11): 831-44.
- Reschke, M.**, Reis, B., Noding, K., Rohsieve, D., Richter, A., Mockenhaupt, T., Garten, W., Radsak, K. (1995). Constitutive expression of human Cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains. *J Gen Virol*. 1995 Jan; 76 ( Pt 1): 113-22.
- Robertson, P. A.**, Ross, H. J., Figlin, R. A. (1989). Tumor necrosis factor induces hemorrhagic necrosis of a sarcoma. *Ann Intern Med* 1989 Oct 15; 111(8): 682-4.
- Roizman, B.** (1996). Herpesviridae. In *Fields Virology*, pp2221-2230. Fields, B. N., Knipe, D.M. & Howley, P.M., (eds.), third edition, Lippincott Raven Publishers, Philadelphia.
- Ruoslahti, E.** (1991). Integrins. *J Clin Invest* 1991 Jan; 87(1): 1-5.
- Ruzek, M. C.**, Miller, A. H., Opal, S. M., Pearce, B. D., Biron, C. A. (1997). Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 1997 Apr 7; 185(7):1185-92.
- Sanes, J. R.**, Rubenstein, J. L., Nicolas, J. F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J*. 1986 Dec 1; 5(12): 3133-42.
- Sievers, E. L. & Radich, J. P.** (2000). Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2000 Jul; 7(4): 212-6. Review.
- Simmen, K. A.**, Jasbir Singh, B. G. Mattias Luukkonen, Matt Lopper, Anton Bittner, Nancy E. Miller, Michael R. Jackson, Teresa Compton, and Klaus Früh (2001).

Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. PNAS 2001 98: 7140-7145.

**Simmen, K. A.**, Singh, J., Luukkonen, B. G. M., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N. E., Jackson, M. R., Compton, T., and Früh, K. (2001). Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. PNAS 2001 98: 7140-7145.

**Sinzger, C.**, Plachter, B., Grefte, A., The, T. H., Jahn, G. (1996). Tissue macrophages are infected by human Cytomegalovirus in vivo. J Infect Dis. 1996 Jan; 173(1): 240-5.

**Skepper, J. N.**, Whiteley, A., Browne, H., Minson, A. (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. J Virol 2001 Jun; 75(12): 5697-702.

**Smith, M. A. & Brennessel, D. J.** (1994). Cytomegalovirus. Infect Dis Clin North Am 1994 Jun; 8(2): 427-38.

**Smith, M. G.** (1954). Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 1954 86: 435ff.

**Smith, S. & Blobel, G.** (1993). The first membrane spanning region of the lamin B receptor is sufficient for sorting to the inner nuclear membrane. J Cell Biol 1993 Feb; 120(3): 631-7.

**Smuda, C.**, Bogner, E., Radsak, K. (1997). The human cytomegalovirus glycoprotein B gene (ORF UL55) is expressed early in the infectious cycle. J Gen Virol 1997 Aug; 78 ( Pt 8): 1981-92.

**Söderberg-Nauclér, C.**, Fish, K. N., Nelson, J. A. (1997). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. J Clin Invest 1997 Dec 15; 100(12): 3154-63.

**Söderberg-Nauclér, C. & Nelson, J. Y.** (1999). Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation - A Delicate Balance between the Virus and Its Host's Immune System. Intervirology 1999; 42: 314-321.

**Soullam, B. & Worman, H. J.** (1993). The amino-terminal domain of the lamin B receptor is a nuclear envelope targeting signal. J Cell Biol 1993 Mar; 120(5): 1093-100.

**Soullam, B. & Worman, H. J.** (1995). Signals and structural features involved in integral membrane protein targeting to the inner nuclear membrane. J Cell Biol 1995 Jul; 130(1): 15-27.

**Stagno, S.**, Pass, R. F., Cloud, G., Britt, W. J., Henderson, R. E., Walton, P. D., Veren, D. A., Page, F., Alford, C. A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. JAMA 1986 Oct 10; 256(14): 1904-8.

- Steffens, H.-P.**, J. Podlech, S. Kurz, P. Angele, D. Dreis, M. J. Reddehase (1998). Cytomegalovirus inhibits the engraftment of donor bone marrow cells by downregulation of hemopoietin gene expression in recipient stroma. *J. Virol.* 72: 5006-5015.
- Steffens, H.-P.**, S. Kurz, R. Holtappels, M. J. Reddehase (1998). Preemptive CD8 T-Cell immunotherapy of acute Cytomegalovirus infection prevents lethal disease, limits the burden of latent viral genomes, and reduces the risk of virus recurrence. *J. Virol.* 72: 1797-1804.
- Stinski, M. F.** (1990). Cytomegalovirus. In *Virology* (Fields, B. N. D. M Knipe, eds.) Raven Press, New York: 1981-2010.
- Stoddart, C. A.**, Cardin, R. D., Boname, J. M., Manning, W. C., Abenes, G. B., Mocarski, E. S. (1994). Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus. *J Virol* 1994 Oct; 68(10): 6243-53.
- Teale, D. M.**, Khidair, I. A., Potter, C. W., Rees, R. C. (1988). Modulation of type IV collagenase and plasminogen activator in a hamster fibrosarcoma by basement membrane components and lung fibroblasts. *Br J Cancer* 1988 May; 57(5): 475-80.
- Terlikowski, S.**, Sulkowski, S., Nowak, H. F. (1997). Regression of Morris hepatoma in response to intralesional treatment with tumor necrosis factor muteins. *Eur Cytokine Netw* 1997 Sep; 8(3):259-63.
- Terlikowski, S. & Nowak, H. F.** (2000). The antitumor effect of intraperitoneal treatment with rhTNF-alpha muteins on Ehrlich ascites tumor growth. *Cancer Biother Radiopharm* 2000 Feb; 15(1): 39-46.
- Terlikowski, S. J.** (2001). Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. *Rocz Akad Med Bialymst.* 2001; 46: 5-18.
- Terlikowski, S.**, Sulkowska, M., Nowak, H. F. (2002). The effect of recombinant human tumor necrosis factor-alpha on Ehrlich ascites tumor growth. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2002;21(1):87-92.
- Terlikowski, S. J.** (2002). Local immunotherapy with rhTNF-alpha mutein induces strong antitumor activity without overt toxicity--a review. *Toxicology* 2002 Jun 5; 174(3): 143-52.
- Thomas, C. u. a.** (1994). *Allgemeine Pathologie.* Schattauer Verlag Stuttgart, 1994, S. 167f.
- van Genderen, I. L.**, Brandimarti, R., Torrisi, M. R., Campadelli, G., van Meer, G. (1994). The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* 1994 May 1; 200(2): 831-6.
- van Regenmortel, M. H.**, Mayo, M. A., Fauquet, C. M, Maniloff, J. (2000). Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch Virol* 2000; 145(10): 2227-32.
- Vey, M.**, Schafer, W., Reis, B., Ohuchi, R., Britt, W., Garten, W., Klenk, H. D., Radsak, K. (1995). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B

(gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* 1995 Jan 10; 206(1): 746-9.

**Virgin<sup>4th</sup>**, H. W., P. Latreille, P. Wamsley, K. Hallsworth, K. E. Weck, A. J. Dal Canto, and S. H. Speck (1997). Complete sequence and genomic analysis of murine gammaherpesvirus 68. *J. Virol.* 1997 71: 5894-5904.

**Vogelmann, R.**, Kreuser, E. D., Adler, G., Lutz, M. P. (1999). Integrin alpha6beta1 role in metastatic behavior of human pancreatic carcinoma cells. *Int J Cancer* 1999 Mar 1; 80(5): 791-5.

**Weller, T. H.**, J. B. Hanshaw und D. E. Scott (1960). Seologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12: 130-132.

**Whealy, M. E.**, Card, J. P., Meade, R. P., Robbins, A. K., Enquist, L. W. (1991). Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *J Virol* 1991 Mar; 65(3): 1066-81.

**Yoon, S.-O.**, Soo-Jin Park, Chang-Hyun Yun and An-Sik Chung (2003). Roles of Matrix Metalloproteinases in Tumor Metastasis and Angiogenesis. 2003; 36(1): 128-137.

**Zhu, H.**, Cong, J.-P., Mamtora, G., Gingeras, T., and Shenk, T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: Global monitoring with oligonucleotide arrays. *PNAS* 1998 95: 14470-14475.

**Zhu, Z.**, Gershon, M. D., Hao, Y., Ambron, R. T., Gabel, C. A., Gershon, A. A. (1995). Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network. *J Virol* 1995 Dec; 69 (12):7951-9.

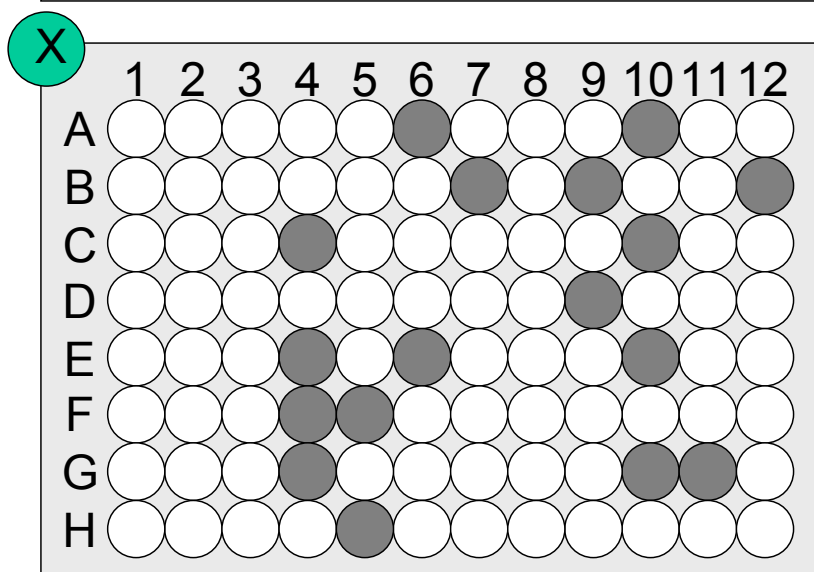
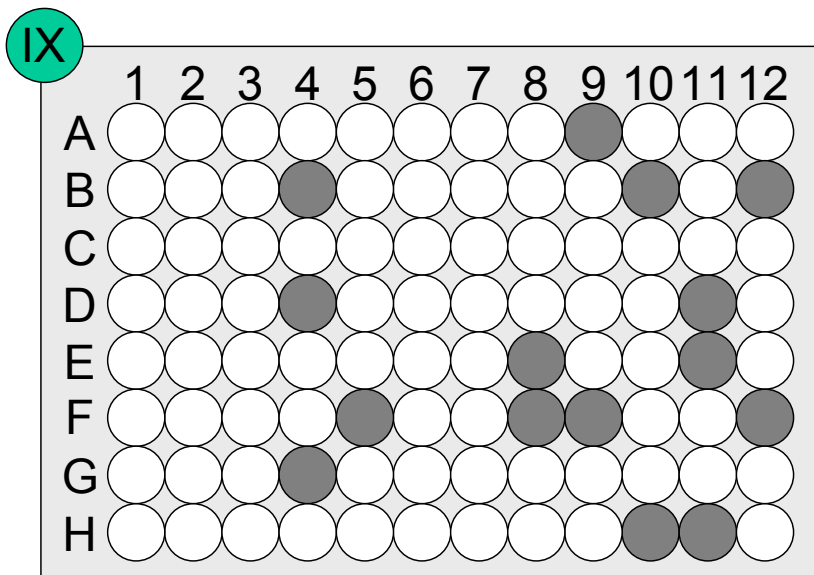
**zur Hausen, H.** (1991). Viruses in human cancers. *Science*. 1991 Nov 22; 254(5035): 1167-73. Review.











**Anhang II** zum Kapitel „*In vivo* Untersuchung der A20/*lacZ*-Klone der ersten Generation“ (Kap. 3.4.1):

Die grau unterlegten Klone wurden nicht untersucht.

*lacZ*-Färbung I nach 2 Wochen

Klon	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
I A4				
I A9		x		
I B2				
I C4				
I C7		x		
I C9		x		
I D5		x		
I E5				
I E10		x		
I G1	x			
I G3		x		
I G10		x		
I H9		x		

*lacZ*-Färbung II nach 4 Wochen

Klon	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
II A4				
II A9	x			
II B2				
II C4				
II C7			x	
II C9			x	
II D5			x	
II E5				
II E10			x	
II G1	x			
II G3			x	
II G10			x	
II H9				x

*lacZ* Färbung III nach 6 Wochen

Klon	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
III A4				
III A9		x		
III B2				
III C4				
III C7			x	
III C9			x	
III D5		x		
III E5				
III E10			x	
III G1	x			
III G3			x	
III G10				x
III H9		x		

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IID11		x		
II E9		x		
II F12				
II G10		x		

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IID11		x		
II E9		x		
II F12				
II G10			x	

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IID11			x	
II E9		x		
II F12				
II G10			x	

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
III A11				
III B10		x		
III C7		x		
III C12		x		
III D2				
III D6			x	
III E3	x			
III F1				
III F3		x		
III F4			x	
III F8			x	
III F9		x		
III G9			x	
III H5				
III H10		x		
III H11				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
III A11				
III B10			x	
III C7		x		
III C12			x	
III D2				
III D6				x
III E3	x			
III F1				
III F3		x		
III F4				x
III F8			x	
III F9			x	
III G9			x	
III H5				
III H10			x	
III H11				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
III A11				
III B10		x		
III C7		x		
III C12		x		
III D2				
III D6				x
III E3	x			
III F1				
III F3		x		
III F4				x
III F8			x	
III F9		x		
III G9				x
III H5				
III H10				x
III H11				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IV B5	x			
IV B12		x		
IV C8	x			
IV D4				
IV E4	x			
IV F1		x		
IV G5	x			
IVG6			x	
IV G7		x		
IV H10		x		

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IV B5		x		
IV B12			x	
IV C8		x		
IV D4				
IV E4	x			
IV F1			x	
IV G5		x		
IVG6		x		
IV G7		x		
IV H10		x		

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IV B5		x		
IV B12		x		
IV C8		x		
IV D4				
IV E4	x			
IV F1		x		
IV G5		x		
IVG6				x
IV G7				x
IV H10		x		

*lacZ*-Färbung I nach 2 Wochen

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
V B4		x		
V B7				
V B9		x		
V C6		x		
V C11		x		
V D4		x		
V D11		x		
V E5		x		
V F1		x		
V F3				
V F6		x		
V F7		x		
V F10		x		
V G7		x		
V G8				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VI D10		x		
VI G6			x	

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VII B8		x		
VII D10			x	
VII F6		x		
VII H10				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VIII A6		x		
VIII B10	x			
VIII B12		x		
VIII C4		x		
VIII C5		x		
VIII C6	x			
VIII C9			x	
VIII C10			x	
VIII D5		x		
VIII D6	x			
VIII D10			x	
VIII E10		x		
VIII E11		x		
VIII F7		x		
VIII G6		x		
VIII H11		x		

*lacZ*-Färbung II nach 4 Wochen

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
V B4	x			
V B7				
V B9		x		
V C6			x	
V C11			x	
V D4		x		
V D11			x	
V E5		x		
V F1			x	
V F3				
V F6		x		
V F7			x	
V F10	x			
V G7			x	
V G8				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VI D10			x	
VI G6		x		

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VII B8			x	
VII D10		x		
VII F6	x			
VII H10				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VIII A6			x	
VIII B10	x			
VIII B12		x		
VIII C4	x			
VIII C5				x
VIII C6	x			
VIII C9			x	
VIII C10		x		
VIII D5			x	
VIII D6	x			
VIII D10				x
VIII E10				x
VIII E11			x	
VIII F7			x	
VIII G6			x	
VIII H11				x

*lacZ* Färbung III nach 6 Wochen

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
V B4		x		
V B7				
V B9		x		
V C6				x
V C11			x	
V D4		x		
V D11			x	
V E5			x	
V F1			x	
V F3				
V F6		x		
V F7				x
V F10		x		
V G7				x
V G8				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VI D10			x	
VI G6		x		

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VII B8		x		
VII D10		x		
VII F6		x		
VII H10				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
VIII A6		x		
VIII B10		x		
VIII B12		x		
VIII C4		x		
VIII C5				x
VIII C6		x		
VIII C9			x	
VIII C10				x
VIII D5		x		
VIII D6	x			
VIII D10		x		
VIII E10				x
VIII E11			x	
VIII F7			x	
VIII G6				x
VIII H11		x		

*lacZ*-Färbung I nach 2 Wochen

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IX A9				
IX B4				
IX B10				
IX B12		x		
IX D4		x		
IX D11		x		
IX E8	x			
IX E11				
IX F5			x	
IX F8			x	
IX F9		x		
IX F12			x	
IX G4			x	
IX H10			x	
IX H11				

*lacZ*-Färbung II nach 4 Wochen

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IX A9				
IX B4				
IX B10				
IX B12				x
IX D4				x
IX D11		x		
IX E8	x			
IX E11				
IX F5			x	
IX F8			x	
IX F9			x	
IX F12			x	
IX G4			x	
IX H10			x	
IX H11				

*lacZ* Färbung III nach 6 Wochen

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
IX A9				
IX B4				
IX B10				
IX B12		x		
IX D4			x	
IX D11		x		
IX E8	x			
IX E11				
IX F5				x
IX F8				x
IX F9			x	
IX F12				x
IX G4		x		
IX H10		x		
IX H11				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
X A6		x		
X A10		x		
X B7	x			
X B9				
X B12		x		
X C4				
X C10		x		
X D9		x		
X E4		x		
X E6		x		
X E10	x			
X F4	x			
X F5		x		
X G4	x			
X G10				
XG11		x		
X H5				

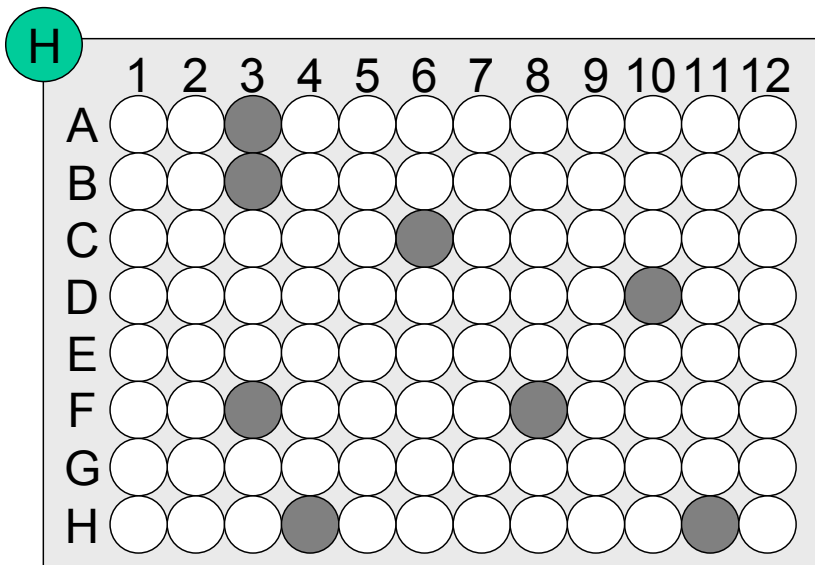
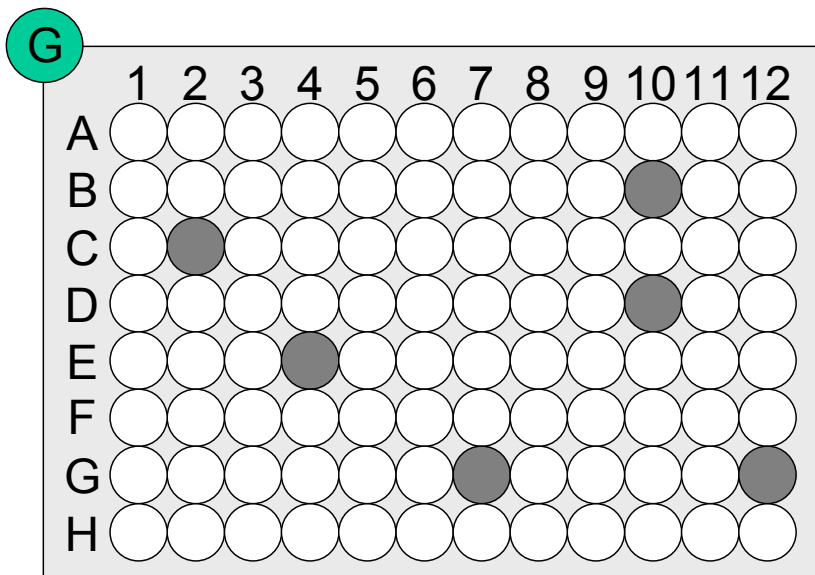
	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
X A6			x	
X A10			x	
X B7	x			
X B9				
X B12		x		
X C4				
X C10			x	
X D9			x	
X E4			x	
X E6			x	
X E10	x			
X F4			x	
X F5			x	
X G4		x		
X G10				
XG11			x	
X H5				

	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
X A6			x	
X A10			x	
X B7		x		
X B9				
X B12		x		
X C4				
X C10			x	
X D9			x	
X E4				x
X E6				x
X E10	x			
X F4		x		
X F5			x	
X G4		x		
X G10				
XG11				x
X H5				











**Anhang IV** zum Kapitel „Generierung der A20//lacZ-Klone zweiter Generation“ (Kap. 3.4.3):

Die grau unterlegten Klone wurden nicht untersucht.

*lacZ*-Färbung I nach 2 Wochen

Klon	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
A1F			x	
A3G			x	
A5G		x		
B10G			x	
C3C		x		
C3H			x	
D6C			x	
D7H				
E12E			x	
E2B	x			
F5B			x	
F7A			x	
H10D			x	
H11H			x	
H3F				x
I10E		x		
I9F			x	
J3B			x	
J7E			x	

*lacZ*-Färbung II nach 4 Wochen

Klon	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
A1F				
A3G				
A5G		x		
B10G				
C3C		x		
C3H				
D6C				
D7H				
E12E			x	
E2B	x			
F5B		x		
F7A				
H10D				
H11H			x	
H3F				
I10E			x	
I9F			x	
J3B		x		
J7E		x		

*lacZ* Färbung III nach 6 Wochen

Klon	negativ	<50%	>50%	~ 100 %
A1F				
A3G				
A5G		x		
B10G				
C3C				
C3H				
D6C		x		
D7H		x		
E12E			x	
E2B	x			
F5B		x		
F7A		x		
H10D		x		
H11H				x
H3F		x		
I10E		x		
I9F			x	
J3B			x	
J7E		x		

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. J. Reddehase möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen und die wissenschaftlichen Diskussionen Dank sagen. Auch hatte ich immer seine volle Unterstützung bei der Präsentation meiner wissenschaftlichen Arbeit auf Kongressen.

Herrn Prof. Dr. G. Wegener danke ich für sein Interesse und die Bereitschaft, diese Arbeit am Fachbereich Biologie zu vertreten.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. J. Podlech für die Betreuung der Arbeit, die wissenschaftlichen Gespräche, seine Zuverlässigkeit und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau A. Denner und Frau A. Rojan für die vielen histologischen Arbeiten und für die unzähligen Auswertungen am Mikroskop bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau D. Thomas für die vielen Tipps und Ideen in der Zellkultur.

Bei Frau Dr. S. Oehrlein-Karpi möchte ich mich, insbesondere in der Endphase dieser Arbeit, für das Korrekturlesen und die vielen Anregungen bedanken.

Mein Dank gilt auch allen anderen, namentlich nicht genannten wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Mitarbeitern, die dem Institut das hervorragende Arbeitsklima verleihen.

Meiner Mutter möchte ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Doktorandenzeit, ihren Beistand und ihre Geduld vielen Dank sagen.

Bei meinem Freund A. Blos möchte ich mich für die Förderung meiner Motivation und sein entgegengebrachtes Interesse und Verständnis bedanken.