

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
Klinikum Rechts der Isar  
( Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

---

Rolle des humanen Cytomegalievirus bei der Induktion der koronaren Restenose:  
Proliferations-induzierende Interaktionen des Virus und distinkter viraler Genregionen  
mit der Zellzyklusregulation humaner koronarer glatter Gefäßmuskelzellen

Angela Röhl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Wessely  
2. Univ.-Prof. Dr. V. Erfle

Die Dissertation wurde am 13.10.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2004 angenommen.

**Meinen Eltern gewidmet**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>Pathogenese der Restenose</b>	<b>7</b>
1.1.1	Verletzung	7
1.1.2	Oxidativer Stress	7
1.1.3	Entzündung	7
<b>1.2</b>	<b>Pathomechanismus der Restenose und In-Stent-Restenose</b>	<b>8</b>
1.2.1	Restenose	8
1.2.2	In-Stent-Restenose	9
<b>1.3</b>	<b>Zellproliferation</b>	<b>11</b>
1.3.1	Extrazelluläre Regulation	11
1.3.2	Intrazelluläre Regulation	11
<b>1.4</b>	<b>Humanes Cytomegalievirus (hCMV)</b>	<b>17</b>
1.4.1	Genomstruktur, Transkription, Genprodukte	17
1.4.2	Epidemiologie und Pathologie	19
<b>1.5</b>	<b>HCMV und Restenose</b>	<b>19</b>
1.5.1	Bedeutung infektiöser Erreger in der Pathogenese von Krankheiten	19
1.5.2	Einfluss von Viren der Herpesgruppe auf die Entstehung vaskulärer Erkrankungen	21
1.5.2.1	Tiermodelle	21
1.5.2.2	Klinische Daten	21
1.5.2.2.1	Rolle des CMV bei der Transplantationsvaskulopathie	22
1.5.2.2.2	Rolle von hCMV bei der koronaren Restenose	22
1.5.3	Molekularbiologische Mechanismen der Wirkung von CMV in der Restenose	22
1.5.3.1	Einfluss auf oxidiertes LDL	23
1.5.3.2	Inhibierung der Apoptose	24
1.5.3.3	Signaltransduktionsweg	24
1.5.3.4	Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Sp1	25
1.5.3.5	Einfluss auf Sekretion von Wachstumsfaktoren und Cytokinen	25
1.5.3.6	Zelluläre Expression von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorisches Potential	26
1.5.3.7	Prokoagulatorische Veränderungen	27
<b>1.6</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Klonierung</b>	<b>29</b>
2.1.1	Material	29
2.1.1.1	Plasmide	29
2.1.1.2	Enzyme	30
2.1.1.3	Längenstandard	30
2.1.1.4	Puffer	30
2.1.1.5	Bakterien	30
2.1.1.6	Kulturmedien	31
2.1.1.7	Platten	31
2.1.2	Methoden	31
2.1.2.1	Restriktionsverdau von Plasmiden	31
2.1.2.2	1% iges Agarosegel für Gelelektrophorese	31

2.1.2.3	Gelelektrophorese.....	32
2.1.2.4	DNA Elution aus dem Agarose Gel .....	32
2.1.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten .....	33
2.1.2.6	Transformation von DH5 $\alpha$ kompetenten E.coli Zellen mit Plasmid-DNA .....	33
2.1.2.7	Isolierung von DNA aus Bakterienzellen und DNA-Preparation .....	33
2.1.2.8	Photometrische Quantifizierung von DNA.....	35
<b>2.2</b>	<b><u>Zellkultur</u></b> .....	<b>36</b>
2.2.1	Material.....	36
2.2.1.1	Chemikalien und Lösungen .....	36
2.2.1.2	Kulturmedien .....	36
2.2.1.3	Zellen.....	36
2.2.2	Methoden .....	37
2.2.2.1	Zellpassagierung.....	37
2.2.2.2	Zellagerung .....	38
2.2.2.3	Zellzählung in der Neubauerkammer .....	38
<b>2.3</b>	<b><u>Zellarretierung mittels FCS Entzug</u></b> .....	<b>39</b>
<b>2.4</b>	<b><u>Herstellung rekombinanter Adenoviren</u></b> .....	<b>39</b>
2.4.1	Material.....	39
2.4.2	Kalziumphosphat Transfektion nach Graham.....	39
2.4.3	Abdeckung der transfizierten Zellen mit Agarüberzug.....	40
2.4.4	Plaquaufreinigung .....	40
2.4.5	Virusnachweis und erste Viruspropagierung .....	41
2.4.6	Viruspropagierung und Herstellung eines Large Scale Prep.....	41
2.4.7	Titerbestimmung des Large Scale Prep durch Plaque forming assay .....	42
<b>2.5</b>	<b><u>Propagierung des hCMV in HFF Zellen</u></b> .....	<b>42</b>
2.5.1	Titerbestimmung des propagierten hCMV .....	43
<b>2.6</b>	<b><u>Proteingewinnung infizierter CASMCs mit Adenovirus IE1 bzw. IE2</u></b> .....	<b>43</b>
2.6.1	Infektion der Zellen für die Proteingewinnung.....	43
2.6.2	Proteingewinnung .....	44
2.6.2.1	Material.....	44
2.6.2.2	Proteingewinnung .....	44
2.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels Bradford Assay.....	44
<b>2.7</b>	<b><u>Western Blot</u></b> .....	<b>44</b>
2.7.1	Material.....	44
2.7.2	Vorbereitung der Proteinproben .....	46
2.7.3	Blotten auf Nitrocellulose .....	46
2.7.4	Antikörpermarkierung der Membran.....	47
2.7.5	Chemoluminiszenz .....	47
<b>2.8</b>	<b><u>Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von infizierten CASMC</u></b> .....	<b>48</b>
2.8.1	Material.....	48
2.8.2	Zellfixierung mit 4% PFA .....	49
2.8.3	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	49
<b>2.9</b>	<b><u>Messung der Zellproliferation mit Zellproliferations – ELISA</u></b> .....	<b>49</b>
2.9.1	Material.....	49
2.9.2	Zellproliferations-ELISA mit Bromodeoxyuridin .....	50
<b>2.10</b>	<b><u>Messung der Zellproliferation mit <sup>3</sup>H Thymidinassay</u></b> .....	<b>50</b>
2.10.1	Material .....	51
2.10.2	Thymidinassay.....	51
<b>2.11</b>	<b><u>Fugene Transfektion und Luciferaseassay</u></b> .....	<b>52</b>
2.11.1	Transfektion.....	52
2.11.2	Luciferaseassay.....	52
<b>2.12</b>	<b><u>Messung der Zytotoxizität</u></b> .....	<b>53</b>
2.12.1	Material .....	53
2.12.2	Assay.....	53

<b>2.13</b>	<b><u>Durchflusszytometrie</u></b> .....	<b>54</b>
2.13.1	Material .....	54
2.13.2	Zellvorbereitung .....	55
2.13.3	Zellfärbung mit Propidium Iodid .....	55
2.13.4	Durchflusszytometrie .....	55
<b>2.14</b>	<b><u>Cyclin A Kinase assay</u></b> .....	<b>56</b>
2.14.1	Material .....	56
2.14.2	Immunpräzipitation .....	57
2.14.3	Kinasereaktion .....	57
2.14.4	SDS-Gelelektrophorese .....	58
<b>3</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b> .....	<b>59</b>
3.1.1	Kinetik zur Zellarrettierung und Synchronisation CASMCs mittels FCS Entzug .....	59
3.1.2	Nachweis der Infizierbarkeit der CASMCs mit hCMV durch indirekte Immunfluoreszenz .....	61
3.1.3	Nachweis der Zellproliferation nach Infektion von CASMCs mit hCMV in MOI von 0,1 bis 10.....	61
3.1.3.1	Zellproliferations-ELISA mit Bromodeoxyuridin.....	61
<b>3.2</b>	<b><u>Charakterisierung der adenoviralen IE1/IE2-Überexpression in CASMCs</u></b>	<b>63</b>
3.2.1	Subklonierung des IE1/IE2 in pBluescript.....	63
3.2.2	Klonierung in den pAcCMV SR(-) Shuttlevektor .....	64
<b>3.3</b>	<b><u>Klonierung eines mit IE1 bzw. IE2 rekombinanten replikationsdefizienten adenoviralen Vektors</u></b> .....	<b>65</b>
3.3.1	Virusnachweis und erste Viruspropagierung .....	66
3.3.2	Viruspropagierung und Herstellung eines Large Scale Prep .....	67
<b>3.4</b>	<b><u>Propagierung der Plaques und Durchführung eines Plaque forming assay in 293 Zellen zur Bestimmung der Titer</u></b> .....	<b>67</b>
<b>3.5</b>	<b><u>Verifikation der rekombinanten Proteinexpression von IE1 und IE2 in CASMC nach Infektion mit IE1 bzw IE2 rekombinanten Adenovirus</u></b> .....	<b>68</b>
3.5.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	68
3.5.2	Westernblot mit hCMV und Ad-IE1 bzw Ad-IE2 zum Nachweis rekombinanter Genexpression Ad-IE1 bzw. Ad-IE2 .....	69
<b>3.6</b>	<b><u>Proteinisolierung zu verschiedenen Zeiten post infectionem</u></b> .....	<b>69</b>
<b>3.7</b>	<b><u>Bestimmung der Proteinkonzentrationen durch den Bradford assay</u></b> .....	<b>70</b>
<b>3.8</b>	<b><u>Proliferationsnachweis durch</u></b> :	<b>71</b>
3.8.1	<sup>3</sup> H Thymidin assay.....	71
3.8.2	Durchflusszytometrie mit Propidium Iodid (PI) zur Bestimmung der Zellzyklusprogression.....	71
<b>3.9</b>	<b><u>Untersuchung der Regulation distinkter Zellzyklusgene mittels Westernblot</u></b> .....	<b>73</b>
3.9.1	Nachweis der Induktion des Cyclin D durch IE2.....	74
3.9.2	Nachweis der Induktion der CDK4 durch IE2: .....	75
3.9.3	Nachweis der Induktion des PCNA (proliferating cell nuclear antigen) durch IE2 .....	76
<b>3.10</b>	<b><u>Induktion des NF-κB Transkriptionsfaktors durch IE2 in CASMCs</u></b> .....	<b>77</b>
<b>3.11</b>	<b><u>Kein Hinweis für Zytotoxizität durch Infektion der CASMCs mit Ad IE1 und Ad- IE2 mittels LDH Assay</u></b> .....	<b>79</b>
<b>3.12</b>	<b><u>Kinaseassay zum Nachweis der Aktivität des Cyclin A/ CDK 2 Komplexes</u></b> . .....	<b>80</b>

<b>4 Diskussion.....</b>	<b>81</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>7 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:.....</b>	<b>113</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>9 Danksagung.....</b>	<b>118</b>
<b>10 Curriculum vitae .....</b>	<b>119</b>

# 1 Einleitung

Trotz der seit 1970 kontinuierlich sinkenden Sterblichkeit an koronarer Herzkrankheit fordern Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland jährlich zahlreiche Todesopfer und gelten mit 180.000 Todesfällen pro Jahr als die Todesursache Nr.1<sup>89</sup>. Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt die Manifestation der Arteriosklerose an den Koronararterien dar und tritt mit einer Prävalenz von bis zu 20% der Männer im mittleren Lebensalter auf<sup>87</sup>.

Bei symptomatischer KHK ist die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und Implantation mechanischer Endoprothesen, sog. Stents, in vielen Fällen die Therapie der Wahl. Sie zeichnet sich gegenüber operativen Bypass-Verfahren durch die wesentlich geringere Invasivität aus. Sie geht mit einer hohen Primärerfolgsrate und einer niedrigen Komplikationsrate einher. Es besteht allerdings das Risiko einer nach 3-6 Monaten auftretenden Wiederverengung des aufgedehnten Gefäßes<sup>217</sup>. Die Restenosierung ist das Hauptproblem nach zunächst erfolgreicher PTCA. Die Angaben über deren Häufigkeit schwanken in der Literatur zwischen 20 und 50% innerhalb der ersten 6 Monate nach PTCA. Durch Stentimplantation kann diese Restenoserate wie die „Benestent“-Studie (Belgium-Netherlands Stent Trial) und „STRESS“-Studie (Stent Restenosis Study) zeigen konnten zwar signifikant minimiert werden<sup>175</sup>, aber auch nach diesen Interventionen treten bei bis zu einem Drittel der Patienten substantielle Lumeneinengungen auf<sup>62</sup>  
173.

Bei diesen sogenannten In-Stent-Restenosen handelt es sich vornehmlich um eine neointimale Hyperplasie als Antwort auf die durch die Intervention entstandene Gefäßverletzung, die durch Proliferation und Migration koronarer glatter Muskelzellen (CASMCs) aus der Media in die Intima charakterisiert ist<sup>99 131</sup>.

Der Zellzyklus und dessen Regulation als Grundlage einer Proliferation stellen einen zunehmend interessanten Aspekt in der Forschung der Pathogenese und der Therapie der Restenose dar. Ein möglicher Therapieansatz ist eine Hemmung der subintimalen Zellproliferation der CASMCs durch einen Eingriff in den Zellzyklusregulationsmechanismus bzw. der Inhibition von Faktoren, die den

Zellzyklus stimulieren, zusätzlich zur Stentimplantation als mechanischer Komponente der Therapie.

Neben den bekannten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit<sup>60</sup> wurden in den letzten Jahren insbesondere infektiöse Ursachen, die auch mit der Arterioskleroseentstehung im allgemeinen in Verbindung gebracht werden, als Risikofaktoren für die Restenosebildung diskutiert. Besonders zwei Erreger fanden hierbei große Beachtung: das Bakterium *Chlamydia pneumoniae* und das humane Cytomegalievirus (hCMV)<sup>126</sup>.

Eine chronische Entzündung wirkt atherogen<sup>104 158</sup>. Das in der Bevölkerung weit verbreitete Cytomegalievirus kann eine chronische Entzündung triggern<sup>31</sup>. Im Tiermodell wurden arteriosklerotische Effekte durch Herpesviren festgestellt<sup>55 56</sup>. Der Nachweis von CMV Antikörpern und Nucleinsäuresequenzen in SMCs von Arteriosklerosepatienten<sup>127 129</sup> legte einen causalen Zusammenhang auch beim Menschen nahe. Mittlerweile gilt eine chronische Entzündung, ausgedrückt durch erhöhtes CRP<sup>136</sup> oder Interleukin 6<sup>15</sup> nach CMV-Infektion, als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität bei Herzgefäßerkrankungen. Der prädiktive Aussagewert von hCMV in Bezug auf die Mortalität ist sogar größer als der verschiedener traditioneller Risikofaktoren wie Diabetes, Hyperlipidämie, Hypertension und Nikotinabusus<sup>136</sup>. Die Provokation der Entzündungsantwort im Wirt scheint ein atherogen wirkender Mechanismus des hCMV zu sein.

Mittlerweile weisen zahlreiche Studien der Infektion durch hCMV eine Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose<sup>129 127 86</sup>, Transplantatvaskulopathie<sup>107 71 180</sup> und Restenose<sup>186 231 16</sup> zu. Über den Mechanismus ist jedoch nichts Genaues bekannt.

Die Rolle des humanen Cytomegalievirus bzw. distinkter viraler Genregionen bei der Induktion der koronaren Restenose (CASMCS) ist das Thema dieser Arbeit. Als Schwerpunkt konzentrierten wir uns insbesondere auf deren Interaktion mit der Zellzyklusregulation humaner koronarer glatter Gefäßmuskelzellen.

Die In-Stent-Restenoserate stellt sowohl klinisch als auch volkswirtschaftlich ein überaus relevantes Problem dar<sup>89</sup>. Dadurch steigt zunehmend die Bedeutung einer erfolgreichen Therapiemöglichkeit.



Falls das hCMV als pathogenetisch bedeutsamer Faktor für die Entstehung der Restenose identifiziert werden könnte, würde die spezifische antivirale Therapie als neue therapeutische Option zur Reduktion der Restenose bei viruspositiven Patienten ins Blickfeld rücken.

## **1.1 Pathogenese der Restenose**

### **1.1.1 Verletzung**

Der Grad an intimaler Verletzung bestimmt das Ausmaß der vaskulären Reparaturmechanismen mit konsekutiv modulierter zellulärer Proliferation und unterschiedlicher Ausprägung an neointimaler Hyperplasie und Restenose<sup>59</sup>. So korreliert die anatomische Tiefe der Penetration des Stent in die Gefäßwand mit der induzierten Zunahme der Neointimaformation<sup>172</sup>.

### **1.1.2 Oxidativer Stress**

Freie Sauerstoffradikale, die während einer Intimaverletzung entstehen, erhöhen die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, aktivieren den multifunktionalen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und modulieren die Expression verschiedener Gene, die die zelluläre Proliferation kontrollieren<sup>50 122</sup>. Antioxidative Therapien konnten durch Verringerung intimaler Hyperplasie und vaskulärem Remodeling die Restenose reduzieren<sup>223 33</sup>.

### **1.1.3 Entzündung**

Zusätzlich zu dem Aspekt der Verletzung bei der Induktion einer Restenose wurde kürzlich die Beteiligung einer Entzündung beschrieben<sup>104</sup>. Es existiert eine Korrelation zwischen dem Entzündungsausmaß, der Schwere der Arterienverletzung und der Neointimaformation, sowie eine lineare Relation zwischen dem Schweregrad des Entzündungszellinfiltrates, ausgedrückt durch Monozytenzahl pro Flächeneinheit, in einem verletzten Segment und dem Ausmaß an arteriellem Intimawachstum<sup>104 162</sup>. Die Entzündung ist durch die Adhäsion und die Rekrutierung von Monozyten nach der Verletzung des Gefäßes charakterisiert. Initial können Veränderungen in der Expression der aktivierungsabhängigen Adhäsionsrezeptoren auf SMCs (ICAM-1), Neutrophilen und Thrombozyten (Mac-1) festgestellt werden<sup>139</sup>. Weiterhin wurde

eine Reduktion intimaler Wandzunahme in Mac-1 (CD11b/CD18)-defizienten Mäusen sowie nach einer Administration eines monoklonalen Antikörpers zu diesem Leukozytenintegrin in Kaninchen festgestellt<sup>161 178</sup>.

Serummarker der systemischen Entzündungsreaktion konnten mit dem Auftreten und der Prognose der koronaren Herzerkrankung in Verbindung gebracht werden.

Das pleiotrope Cytokin Interleukin 6 (IL6), das von Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen als Reaktion auf proinflammatorische Stimuli sekretiert wird, ist zusammen mit dem C-reaktiven Protein (CRP) ein Schlüsselmediator der Akut-Phase-Antwort. CRP, ein hepatisches Akut-Phase-Protein ist ein aussagekräftiger Marker für frühes als auch spätes Outcome in Patienten nach PTCA<sup>22</sup>. Es ist erhöht bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt<sup>40 149</sup> und gilt bei Patienten mit stabiler Angina<sup>84</sup>, instabiler Angina<sup>116 196</sup> und Z.n. Myokardinfarkt<sup>159</sup> als Risikofaktor für das Wiederauftreten von ischämischen Ereignissen. Sogar bei gesunden Personen wurde unabhängig vom Risikofaktorenstatus eine Assoziation zwischen initialen CRP-Werten und dem Risiko, zukünftig ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden, berichtet<sup>158</sup>.

Insgesamt scheint ein komplexes Zusammenspiel von Reparaturmechanismen nach Verletzung, Infektion und inflammatorischer Immunantwort bei der Atherogenese eine Rolle zu spielen.

## **1.2 Pathomechanismus der Restenose und In-Stent-Restenose**

### **1.2.1 Restenose**

Die koronare Restenose resultiert aus einem Wundheilungsprozess der Arterie nach einer durch transluminale, koronare Revaskularisation entstandenen Verletzung.

Dem Gefäßendothel kommt eine wesentliche Bedeutung in der Pathogenese der Restenose zu. Durch die Ballondilatation einer Koronarstenose kommt es in der Regel zu Einrissen der Gefäßintima und –media. Durch die Denudation geht die antithrombogene und schützende Funktion des Endothels verloren und thrombogenetisches Subendothel wird freigesetzt<sup>59</sup>. Es kommt zu einer lokal verminderten NO<sup>63</sup> und Prostacyclin<sup>163</sup> Freisetzung. Die lokal verminderte NO-Konzentration verursacht eine Hochregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie den Selektinen (CD 62P,CD 62E) oder dem intrazellulären

Adhäsionsmolekül 1 (ICAM 1), welche die Adhäsion von Thrombozyten, Neutrophilen und Monozyten fördern<sup>38</sup>. Dabei kann sich eine ein- oder mehrlagige Schicht von Thrombozyten und Leukozyten bilden, die an der funktionell gestörten Endothelzellschicht, an der Basalmembran oder an der subendothelialen Strukturen adhären. Die u.a. aktivierten Thrombozyten setzen zahlreiche vasoaktive und mitogene Mediatoren wie den Plättchen-Wachstumsfaktor (engl. platelet-derived growth factor; PDGF), den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. basic fibroblast growth factor; FGF), den Epidermalen-Wachstumsfaktor (endothelial cell growth factor; ECGF) sowie Serotonin, Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A2 frei und tragen zur lokalen Thrombinbildung bei. Dadurch kommt es zu einer Vasokonstriktion und zur Stimulation von glatten Muskelzellen (SMC) der Gefäßmedia und der Fibroblasten aus der Adventitia. Die stimulierten SMCs migrieren unter dem Einfluss von PDGF wahrscheinlich entlang eines Konzentrationsgradienten von der Media in die Intima und zeigen eine sehr hohe Zellaktivität. SMCs aus Restenoseläsionen weisen im Vergleich zu Zellen aus Primärstenosen in vitro eine etwa um den Faktor 4 erhöhte Proliferationsrate auf<sup>39</sup>. Bei der intimalen Läsion verändert sich der Phänotyp der SMCs und wechselt von einem "kontraktilen" Status mit hohem Gehalt der SMCs an Myofilamenten zu einem „synthetischen“ Phänotyp. Dieser ist durch eine Fülle von rauhem endoplasmatischem Retikulum und Golgi Körpern mit wenig und manchmal keinen Anzeichen von Myofilamenten charakterisiert<sup>197</sup>.

Diese Modulation von einem kontraktilen zu einem synthetisierenden Phänotyp gilt als Voraussetzung für die migratorische und proliferative Stimulierbarkeit der SMCs. Die stimulierten SMCs wandern durch die Lamina elastica interna, proliferieren dort mitogen-unabhängig und bilden nach Wochen zusammen mit der extrazellulären Matrix und intimaalem Wachstum eine Neointima, die das Gefäßlumen verengt und zur klinischen Restenose führen kann<sup>38</sup>.

### **1.2.2 In-Stent-Restenose**

Die percutane transluminale Koronarangioplastie mit Stentimplantation hat das effektive Management des ischämischen Syndroms koronarer Gefäßerkrankung und ihrer Symptome deutlich verbessert. Eine reduzierte Rate an Restenose hat zur Verwendung von koronaren Stents bei mehr als 70% der Fälle geführt. Mehr als 800.000 Prozeduren mit weiter steigender Tendenz wurden alleine in den USA im Jahr 1999 durchgeführt<sup>199</sup>. Die stark zunehmende Verwendung von Stents hat

jedoch zur Erkenntnis geführt, dass bei 10-50% der Fälle eine In-Stent-Restenose (ISR) auftritt. In den USA waren es allein im Jahr 1999 150 000 Patienten <sup>166 165</sup>. Daher tritt die Bedeutung der In-Sten-Restenose und deren Vorbeugung sowie therapeutische Maßnahmen in den Vordergrund der Forschungen der interventionellen Kardiologie.

Die ISR unterscheidet sich histologisch von der Restenose nach konventioneller Balonangioplastie <sup>134 121</sup>. Während nach der Dilatation durch einen Ballonkatheter das sog. negative Gefäßremodeling den entscheidenden Faktor bei der Restenose spielt, kann durch Implantation eines Stents die Neigung des Gefäßes sich wieder zusammenzuziehen gehemmt werden. Dieser „elastic recoil“ wird durch elastische Fasern verursacht, um das Gefäß an den pulsatilem Blutfluß und die hämodynamischen Veränderungen sowie die Druckveränderungen anzupassen <sup>164</sup>. Durch die Stentimplantation wird eine verminderte Zunahme der neointimalen Wanddicke erzielt. Stenting reduziert somit den sog. elastic recoil und negatives Remodelling, so dass ISR weitgehend aus einer neointimalen Formation resultiert <sup>121 135 91</sup>. Bei der In-Stent-Restenose besteht die Neointima hauptsächlich aus proliferierten SMCs aus der Media <sup>103 99 73</sup> und extrazellulärer Matrix <sup>206</sup>.

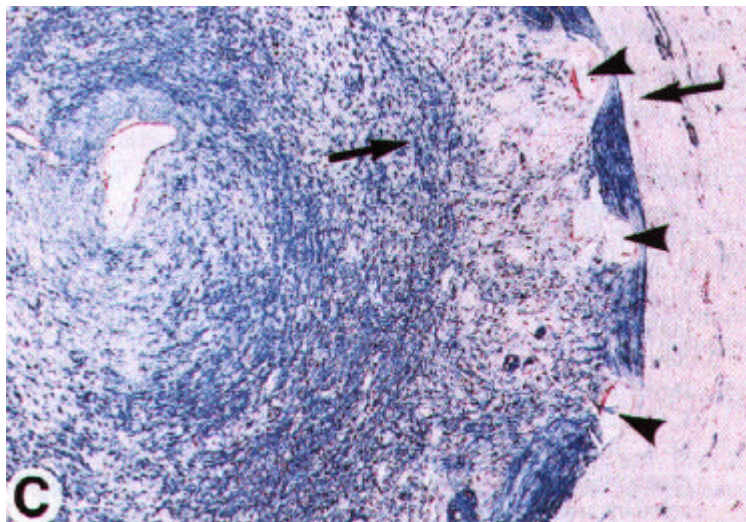


Abb. 1: Immundoppelfärbung mit 1A4 (monoklonaler Anti-SMC  $\alpha$ -Actin IgG-Antikörper) und HAM-56 (Anti-Makrophagen IgM Antikörper) einer In-Stent-Restenose: neointimale Hyperplasie 85 Tage nach einer Stent Implantation mit subtotalem Gefäßverschluss. Um den Stent (Pfeilspitzen) finden sich im Bereich zwischen den Pfeilen im Rahmen der chronischen Entzündung Makrophagen (rot) und eutrophile Granulozyten, in der oberflächlichen Schicht der neointimalen Proliferation befinden sich hauptsächlich CASMCs (türkis) <sup>103</sup>.

## 1.3 Zellproliferation

### 1.3.1 Extrazelluläre Regulation

Die lokale Stimulation der Zellproliferation ist eine wesentliche Grundlage des Restenoseprozesses.

Sie basiert auf dem Einfluss verschiedener extrazellulärer Wachstumsfaktoren. Die Induktion von c-fos, c-jun und c-myc mRNA erfolgt unmittelbar nach der Intervention und induziert die Bildung der Wachstumsfaktoren<sup>145</sup>. Daher entstand die sog. Onkogenhypothese der Atherogenese. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren gehen Zellen in die G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus über oder sterben durch Apoptose. PDGF ist der potenteste mitogene Faktor für Zellen mesenchymalen Ursprungs. Er wird von aktivierten Plättchen, Makrophagen, SMCs und Endothelzellen synthetisiert und sezerniert. PDGF<sup>61</sup> wird eine wichtige Rolle für die Migration der SMCs in die Intima zugewiesen<sup>141</sup> und gilt als „Kompetenzfakt“ für den Eintritt in den Zellzyklus, welcher es den Zellen ermöglicht, aus dem Ruhestadium G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus einzutreten. Die so stimulierten Zellen benötigen für die Progression des Zellzyklus eine zweite Gruppe von Wachstumsfaktoren, die Progressionsfaktoren<sup>145</sup>, von denen der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor Typ 1 (insulin like growth factor type 1; IGF-1), EGF, FGF und der Transformierende Wachstumsfaktor (transforming growth factor  $\beta$ ; TGF $\beta$ ) von Bedeutung sind. TGF $\beta$  ist bei der Aktivierung der Matrixproduktion beteiligt<sup>160</sup>.

### 1.3.2 Intrazelluläre Regulation

Extrazelluläre Faktoren binden an ihre spezifischen Rezeptoren an der Zelloberfläche und können dort eine kaskadenartige Abfolge von Reaktionen innerhalb der Signaltransduktion auslösen, die schließlich zur vermehrten Zellteilung führen kann. Bestandteile dieser Kaskade sind verschiedene Thyrosinkinassen, G-Proteine (z.B. ras), Effektorproteine und membran-assoziierte und zytoplasmatische Proteinkinassen<sup>117</sup>.

## Der Zellzyklus und seine Regulation

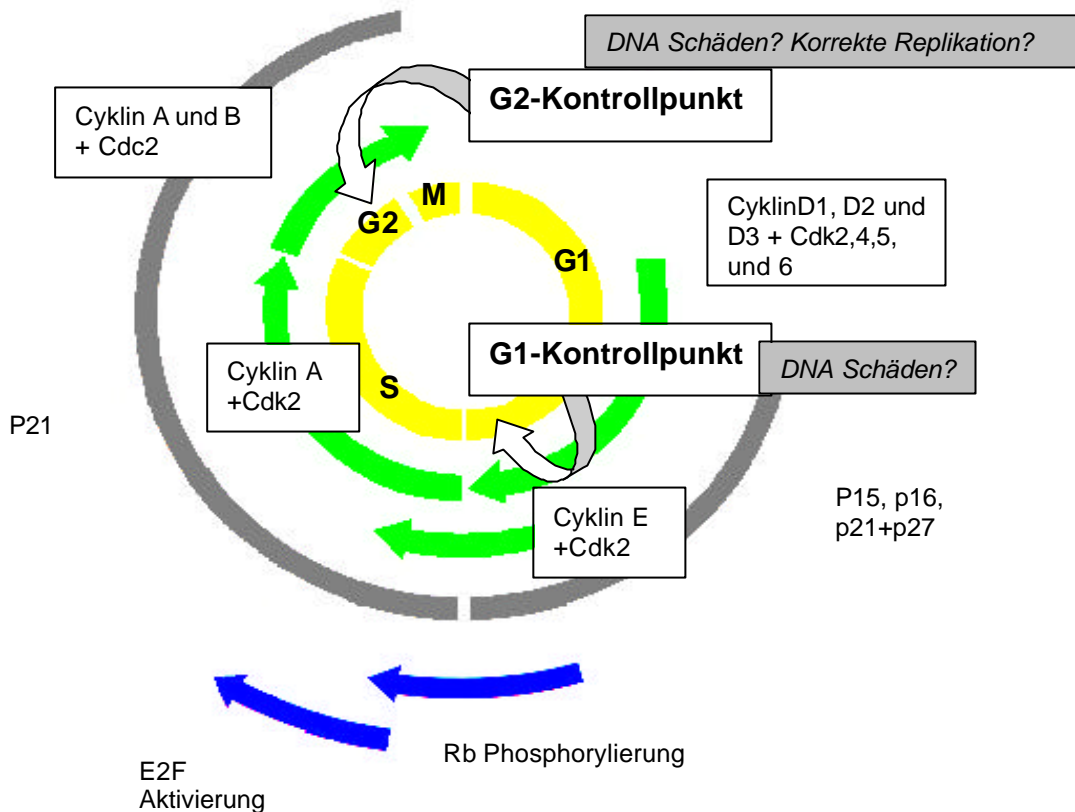


Abb. 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus mit ausgewählten Checkpoints zur Kontrolle der korrekten Reihenfolge und Durchführung der Abläufe (gelb), sowie der Rolle und zeitlichen Beteiligung verschiedener Cycline und Cyclin-abhängiger Kinasen (grün), modifiziert nach Zettler 2000<sup>229</sup> und Nigg 1995<sup>142</sup>.

### eukaryonter Zellzyklus:

Der Zellzyklus stellt die Grundlage der Zellproliferation dar, und bietet somit einen Angriffspunkt in der Behandlung der In-Stent-Restenose. Die Hemmung der subintimalen Zellproliferation der CSMCs könnte durch einen Eingriff in den Zellzyklusregulationsmechanismus erfolgen.

Der Zellzyklus besteht aus 4 Phasen: G1, S, G2 und M. Ruhende Zellen befinden sich in der G0-Phase, einem Status mit minimaler mRNA und Proteinsynthese. Eine Zelle kann in diesem Status für viele Jahre verweilen. Sie kann jedoch auf verschiedenste Stimulation durch z.B. Wachstumsfaktoren jederzeit in die G1-Phase des Zellzyklus eintreten. In der G1-(Gap)-Phase bereitet sich die Zelle auf die S-(Synthese)-Phase vor, in der die DNA repliziert wird. Zwischen der S- und der M-Phase liegt die G2-Phase, in der die Zelle u.a. mRNAs und Proteine, die für die Zellteilung benötigt werden, synthetisiert. In der M-(Mitose)-Phase erfolgt die Zellkern- und Zellteilung (Cytokinese). Nach der Mitose können die Zellen einen erneuten Zellzyklus durchlaufen oder in die G0-Phase übergehen.

### Regulation des Zellzyklus:

Die Zellzyklusmaschinerie wird durch ein Zellzykluskontrollsystem gesteuert. Dieses Kontrollsystem vermag den Zellzyklus an bestimmten Stellen, den sog. Checkpoints, zu arretieren. Es existieren 2 Checkpoints, einer kurz vor dem Übergang der G1- in die S-Phase und einer kurz vor dem S-G2 Übergang. An diesen Übergängen prüft die Zelle intrazelluläre und extrazelluläre Bedingungen, um gegebenenfalls bei unvollständiger Replikation, fehlerhafter DNA oder mangelhafter Zellumgebung durch bestimmte Mechanismen den Replikationsvorgang zu unterbrechen<sup>117</sup>.

Eine Zellzyklusunterbrechung ist also an mehreren Stellen möglich. Zur Therapie der Restenose erscheint eine Intervention in der G1-Phase am günstigsten, da so Signaltransduktionen, die von aktivierten Zellzyklusproteinen ausgehen, frühestmöglich unterbunden werden können.

Die Regulation im Zellzyklus erfolgt durch eine Kaskade von Phosphorylierungen von kritischen Proteinen, die DNA-Replikation, Mitose und Cytokinese initiieren und regulieren können.

Diese Phosphorylierungen werden durch Proteinkinasen, den sog. Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), katalysiert. Es sind mindestens sieben Proteinkinasen bekannt: CDC2 (CDK1), CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6 und CDK7<sup>114</sup>.

Proteinkinasen werden in proliferierenden Zellen während des gesamten Zellzyklus exprimiert, werden aber nur zu bestimmten Zeiten des Zyklus aktiviert und kurz darauf wieder deaktiviert. Proteinkinasen werden durch Anbindung von Cyclinen und durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen aktiviert. Die Aktivität jeder

einzelnen Kinase steigt und fällt zyklisch. Einige der Proteinkinasen werden gegen Ende der G1-Phase aktiviert und sind verantwortlich für die Einführung der Zelle in die S-Phase, andere führen, nachdem sie erst kurz vor der Mitose aktiviert werden, zur Einleitung der Zelle in die Mitose<sup>194</sup>.

CDK4, 5 und 6 bilden hauptsächlich mit der Cyclin D-Familie Komplexe und sind während der G0/G1-Phase von Bedeutung. Die CDK2 kann ebenfalls Mitglieder aus der D-Familie binden, agiert jedoch gewöhnlicherweise mit den Cyclinen A und E während der G1-Phase und des G1/S-Übergangs<sup>114</sup>. Die Proteinkinase 7 bindet das Cyclin H und kann entweder das CDC2, CDK2 oder das C-terminale Ende der größten Untereinheit der RNA Polymerase II phosphorylieren<sup>123</sup>. CDC2 bindet Cyclin A und E und fungiert in den S-, G2- und M-Phasen des Zellzyklus.

Cycline sind regulatorische Proteine, die einem zyklischen Auf- und Abbau unterliegen. Cycline haben keine enzymatische Aktivität, sondern haben die Aufgabe, die Kinasen zu den von ihnen zu phosphorylierenden Proteinen zu leiten. Es sind mindestens 12 verschiedene Cycline bekannt, die jeweils an bestimmten Stellen im Zellzyklus exprimiert werden und mit ihren CDKs einen aktiven Cyclin-CDK-Komplex bilden<sup>142</sup>.

Cyclin C, D und E sind kurzlebige Proteine, die hauptsächlich in der G1-Phase und dem G1/S-Übergang Bedeutung haben, bevor sie zerstört werden<sup>202</sup>. Es gibt 3 Typen D Cycline: D1, D2 und D3.

Die Cycline A und B ( B1, B2, B3) sind mitotische Cycline, die während der Interphasen stabil bleiben, aber in der Mitose proteolysiert werden<sup>142</sup>. Über die erst kürzlich beschriebenen Cycline F und G ist bisher nur wenig bekannt. Vom neuen Cyclin H konnte gezeigt werden, dass es mit dem CDK 7 spezifische Komplexe bildet, um ein Enzym, das als Cyclin-abhängige, aktivierende Kinase bekannt ist, zu produzieren. Diese Cyclin-abhängige, aktivierende Kinase ist in die Aktivierung der CDC2 und CDK2 Kinasen involviert<sup>123</sup>.

Bedeutung der Cycline:

Die Progression in der G1-Phase benötigt hauptsächlich die Aktivierung der Typ D Cycline und des Cyclin E<sup>93</sup>. Die Typ D Cycline werden in der frühen G1-Phase als Antwort auf Cytokine synthetisiert, während das Cyclin E während der zweiten Phase von G1 akkumuliert. Der Übergang in die S-Phase wird v.a. durch den Cyclin E/CDK 2-Komplex katalysiert<sup>11</sup>. Für die Progression in der S-Phase ist der Cyclin A/CDK 2-Komplex hauptverantwortlich, der Cyclin B/CDK 2-Komplex vermittelt den G2-/M-



Übertritt<sup>150</sup>. Das Cyclin C Niveau verändert sich gering während des Zellzyklus, weist aber in der frühen G1-Phase einen Peak auf.

Negativ reguliert wird der Zellzyklus durch inhibitorische Proteine (CKI).

Das sind Proteine, die an G1 Cyclin/CDK-Komplexe anbinden und diese inaktivieren. Dadurch können sie eine Zellzyklusunterbrechung induzieren.

In Säugerzellen können die CKI in zwei unterschiedliche Familien eingeteilt werden: die INK4-Familie und die CIP/ KIP-Familie.

Die INK4 Familie inhibiert mit p14, p15 (INK4B), p16 (INK4A), p18 (INK4C), und p19 (INK4D) spezifisch Cyclin D/CDK4 und CyclinD/CDK6 Komplexe und ist in die G1-Phasen Kontrolle involviert<sup>229</sup>.

Die CIP/ KIP Familie hingegen schließt p21 (CIP/WAF1/SDI1), p27 (KIP1) und p57 (KIP2) ein und reguliert die Zellproliferation während des gesamten Zellzyklus<sup>21 151 67</sup>.

p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein typischer eukaryonter Transkriptionsfaktor, der an spezifische DNA Sequenzen, gen. „p53 responsive elements (PRE)“, bindet, um die Transkription der Zielgene zu stimulieren. P53 ist ein wichtiger negativer Regulator der Zellproliferation. So wird es bei DNA-Schäden induziert und bewirkt einen G1-Arrest über die Aktivierung der Expression von p21, einem Inhibitor der Cyclin E-abhängigen Kinaseaktivität<sup>45 48 77 83 220</sup>. Die Bindung von p21 an den Polymerase-Cofaktor Proliferations-Zellkern-Antigen (PCNA) führt zu seiner Inaktivierung und verhindert so die DNA-Replikation<sup>115</sup>. Die Bindung von p21 an Cyclin D/CDK4/6 verhindert die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb). Hypophosphoryliertes Rb bleibt an den Transkriptionsfaktor E2-F gebunden und verhindert damit den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus<sup>229</sup>. So wird es der Zelle ermöglicht, den DNA-Schaden zu beheben. Ein Verlust der p53-Funktion resultiert in Genominstabilität und verhindert die Wachstumspause in der G1-Phase.

Eine Vielzahl anderer Genprodukte wie das Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), das Retinoblastoma Protein (Rb) und Mitglieder der E2F-Familie der Transkriptionsfaktoren vermögen ebenfalls mit Cyclin/Cyclin-abhängigen Kinase-Komplexen zu interagieren und deren Aktivität zu modulieren.

Rb übt einen entscheidenden Einfluss auf die Kontrolle über die Zellzyklusprogression von der G1- in die S-Phase. Dies ist zum Großteil auf die

Fähigkeit des Proteins, an Transkriptionsfaktoren wie E2F zu binden und es zu verändern, zurückzuführen<sup>194</sup>.

In der G<sub>0</sub>-Phase ist Rb in seiner hypophosphorylierten Form vorhanden, in der es einen potenten Inhibitor der Zellzyklusprogression darstellt. Hypophosphoryliertes Rb bindet an den Zellzyklustranskriptionsfaktor E2F und hemmt dessen Aktivität, wodurch die Transkription von Genen, die am Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase beteiligt sind, wie CDC2 und PCNA verhindert wird<sup>27 213</sup>.

Rb wird durch den Cyclin D/CDK-Komplex phosphoryliert, wodurch sich seine Konformation verändert. Es löst sich von E2F ab und ermöglicht dadurch den Übergang von G<sub>1</sub> - in die S-Phase<sup>32 41</sup>.

### p107

Das p107 Protein ist ein anderer negativer Regulator des Zellzyklus. Eine Überexpression von p107 hat gezeigt, dass es ähnlich dem Rb bei bestimmten Zellen einen Wachstumsarrest in der G<sub>1</sub>-Phase bewirkt. Der genaue Mechanismus ist nicht genau geklärt, dennoch scheint er zumindest zum Teil -ähnlich dem Rb- auf einer Transkriptionshemmung von E2F zu beruhen, woraus ein G<sub>1</sub>-Phasenarrest und konsekutiv eine Prävention der DNA-Replikation resultiert<sup>153 237 238</sup>.

### NF-κB

NF-κB ist ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor. Er ist für die Regulation der Transkription bestimmter zellulärer und viraler Gene zuständig, einschließlich der *c-myc* Onkogene<sup>110 94</sup>, verschiedener Interleukine, Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und des Cytomegalievirus<sup>168 28</sup>. Die Induktion von NF-κB kann in vielen verschiedenen Zelltypen als Antwort auf entzündliche Vorgänge, z.B. IL-1 Expression, TNFα, Adhäsion, oxidativen Stress und oxidiertem LDL, erfolgen<sup>12</sup>.

Die Aktivierung erfolgt durch Freisetzung des NF-κB von seinem Inhibitor IκB im Cytoplasma.

## 1.4 Humanes Cytomegalievirus (hCMV)

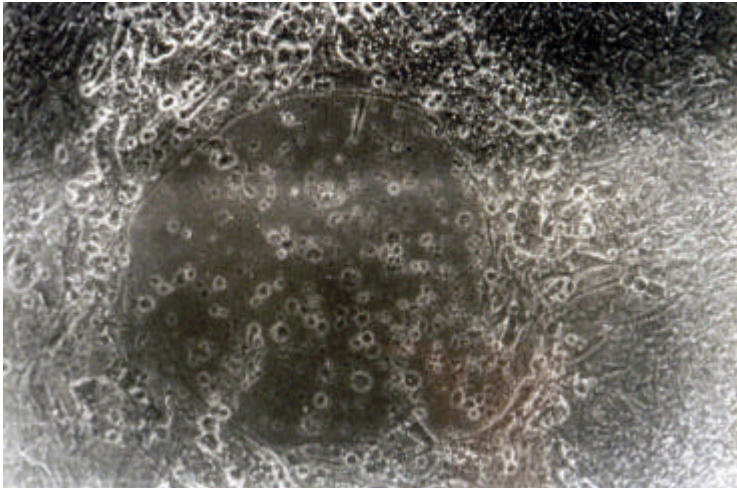


Abb. 3: hCMV Plaque in HFF Zellen (Pfeil), 18d post infectionem mit MOI -1

### 1.4.1 Genomstruktur, Transkription, Genprodukte

HCMV ist ein ubiquitäres 150-200 nm großes DNA-Virus aus der Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviridae. Typisch für die Betaherpesviren ist die sehr langsame Vermehrung. In vitro dauert ein Replikationszyklus mehrere Tage, wobei bereits die frühen Abläufe verzögert sind (Initiation der DNS-Synthese nach 12-24h im Unterschied zu 4-6 h bei Alphaherpesviren). Eine auch für die Diagnostik relevante Konsequenz ist, dass die sichtbaren zytopathischen Effekte, sog. Plaques, in Zellkulturen erst nach 7-14 Tagen zu erwarten sind<sup>157, S.259</sup>.

Mit einem Genom von 229 kb-Paaren codiert hCMV mehr als 200 Proteine. Das Genom ist in ein langes (UL) und in ein kurzes einmaliges Segment (US) unterteilbar. Die L und S Untereinheit können während der Replikation intervertieren, so dass ein Virion eine von vier Varianten enthält<sup>85</sup>.

Die Synthesevorgänge des Virus in der Wirtszelle laufen kaskadenartig in drei Stufen ab. Es werden dementsprechend drei Kategorien von Genen, Genprodukten und Replikationsvorgängen unterschieden: Immediate Early (IE) (Stunden nach Infektion), Early (24 Stunden und mehr), und Late Phase<sup>68</sup>.

HCMV Gene werden im infizierten Zellkern durch RNA Polymerase II und der assoziierten Transkriptionsmaschinerie des Wirtes transkribiert, deren Aktivität durch virale Transaktivatoren stimuliert wird<sup>64</sup>.

Während der IE-Phase werden nur wenige Proteine exprimiert. Die Expression der IE-Gene verlangt keine vorherige Proteinsynthese, da diese Gene auch in

Anwesenheit von Proteinsyntheseinhibitoren wie Cycloheximide transkribiert werden  
190,S.331

IE-Gene sind die ersten exprimierten Gene, nachdem das Virus die Wirtszelle infiziert hat, und regulieren die folgende virale und zelluläre Genexpression.

Die IE1/IE2-Region steht unter der Kontrolle eines Enhancer (MIEP) <sup>85</sup>.

Das phosphorylierte IE1-Protein (68-72kD) ist das mengenmäßig am meisten gebildete IE Protein und wird von einer mehrfach gespleisten mRNA aus vier Exons translatiert. Die aminoterminalen 85 AS werden in den Exons 2 und 3 codiert, die restlichen 406 Reste im Exon 4, das dem Leserahmen UL123 entspricht <sup>190</sup>.

Die ebenfalls phosphorylierten IE2-Proteine (86 kD) werden in unterschiedlichen Versionen synthetisiert. Die aminoterminalen 85 AS sind identisch mit denen des IE1-Proteins und durch Spleißvorgänge werden die im Leserahmen UL122 codierten Sequenzen angefügt <sup>190</sup>.

IE1- und IE2-Proteine sind nukleare Proteine. Sie spielen eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der folgenden viralen Synthesevorgänge. Die Fähigkeit der IE1- und IE2-Proteine, Genexpression zu regulieren, hat zur Erkenntnis geführt, dass diese Proteine die Transkription nicht nur viraler, sondern auch zellulärer Gene in hCMV infizierten Zellen, besonders mit Zellproliferation assoziierte, regulieren <sup>234</sup>.

Sie wirken synergistisch, verstärken ihre transaktivierende Wirkung also, und aktivieren eine große Anzahl von zellulären Promotoren. Beide sind z.B. erforderlich zur Aktivierung des DNA Polymerase Promoters, eines Gens, das essentiell für die DNA Replikation ist <sup>191</sup>.

Das IE1-Protein stimuliert die Expression des zellulären Transaktivators NF- $\kappa$ B und verstärkt dessen Aktivität (siehe unten). Im Komplex mit NF- $\kappa$ B induziert das IE1-Protein seine eigene Expression und die der Early- und der Late-Gene.

Auch das IE2 hat als Hauptaufgabe die Regulation der Genexpression und kann - im Gegensatz zum IE1 - DNA spezifisch binden. IE2 reguliert negativ seinen eigenen Promoter <sup>191</sup>.

Aktiviert durch die Produkte der IE-Phase beginnt die Transkription der „Early-Gene“, die virale Proteine für die virale DNA-Replikation codieren. Virale DNA-Replikation ermöglicht wiederum die Transkription der „Late-Gene“, die strukturelle Proteine, die in die Synthese des Virions involviert sind, synthetisieren <sup>137</sup>.

## 1.4.2 Epidemiologie und Pathologie

HCMV ist weit verbreitet, 50% aller 30jährigen und mehr als 70% aller 65jährigen haben Antikörper gegen hCMV. Wie alle Herpesviren hält es sich lebenslang latent im Körper auf, um z.B. bei verminderter Immunitätslage reaktiviert zu werden.

Die Erstinfektion mit hCMV verläuft bei immunkompetenten gesunden Menschen in der Regel asymptomatisch. Bei einer verminderten zellulären Immunität kann hCMV zu Pneumonie, Encephalitis, Retinitis, Hepatitis und Gastroenteritis führen. Eine Infektion in utero kann zu kongenitalen neurologischen Komplikationen einschließlich mentaler Retardierung, sensorineuralem Hörverlust, aber auch zum Tode führen<sup>8 90</sup>. Obwohl ursprünglich angenommen worden war, dass hCMV bei immunkompetenten Menschen keine Erkrankungen verursacht, wird hCMV auch mit der Entstehung koronarer Gefäßerkrankungen in Verbindung gebracht.

Charakteristisch für hCMV ist, dass es nur eine limitierte Auswahl an permissiven Zellen gibt, die den vollständigen Lebenszyklus des Virus überleben, wie z.B. Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen<sup>43</sup>.

## 1.5 HCMV und Restenose

### 1.5.1 Bedeutung infektiöser Erreger in der Pathogenese von Krankheiten

Infektiöse Erreger spielen in der Pathogenese vieler Erkrankungen eine entscheidende Rolle. So gilt z.B. das Bakterium *Helicobacter pylori* als Ursache für die Entstehung der chronischen Gastritis Typ B, der Antrumgastritis mit peptischen Ulcerationen, bei der die Dichte einer *Helicobacter*-besiedlung den Grad der Gastritis und die Aktivität bestimmt. Auch besteht ein erhöhtes Risiko einer Entwicklung eines Magencarcinoms. Von bestimmten Viren ist ebenfalls ein onkogenes Potential bekannt: Papova Viren können beispielsweise das humane Zervixcarcinom induzieren<sup>240</sup>.

Im Zusammenhang mit der Entstehung der Arteriosklerose und Restenose werden seit Jahren sowohl das Bakterium *Chlamydia pneumoniae* als auch das humane Cytomegalievirus als beteiligte Faktoren diskutiert<sup>126</sup>.

Besonders hCMV lieferte in den letzten Jahren deutliche Hinweise auf eine Assoziation des Virus mit dem Arteriosklerose-Prozess, vor allem durch die Entdeckung von bei Infektion entstandenen mechanistischen zellulären

Veränderungen, die mit proatherosklerotischen Effekten in Einklang stehen<sup>233</sup>. CMV ist ein intrazelluläres Pathogen, das einen Auslöser für chronische lokale Entzündung darstellt und somit den Entzündungsprozess, dem eine wesentliche Rolle bei dem atherogenen Prozess zugewiesen wird, triggern könnte<sup>158 196</sup>. Eine Studie von Zhu et al zeigte, dass insbesondere bei Personen, die eine Entzündungsantwort auf CMV-Infektion zeigten, charakterisiert durch eine Erhöhung des CRP, eine atherogene Wirkung des CMV auftrat<sup>235</sup>. So scheint eine Provokation einer inflammatorischen Reaktion im Wirt ein Mechanismus zu sein, durch den CMV zur Atherogenese beiträgt.

Myelomonozytische Vorläuferzellen scheinen dem hCMV als Reservoir zu dienen und Monozyten als Vehikel, die das Virus zu dem Ort der vaskulären Entzündung transportieren<sup>78</sup>. In den zirkulierenden Monozyten befindet sich das CMV in einem latenten Status, d.h. es exprimiert keine viralen Genprodukte trotz Präsenz des viralen Genoms, wohl um keinen zytopathischen Effekt auf sein „Transportsystem“ auszuüben. Die Expression von IE Genprodukten erfolgt erst nach der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen<sup>195</sup>. Es scheint, dass, je differenzierter der Monozyt, desto eher eine virale Genexpression möglich ist<sup>78</sup>. Um die Einflüsse der Gefäßkomponenten auf die Genaktivität des CMV zu untersuchen, mass man die MIEP (major IE promoter) -Aktivität in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Ecs, SMCs und oxLDL. Es stellte sich heraus, dass die MIEP-Aktivität unter dem Einfluss von Endothelzellen (Ecs) um das 1,7 fache, von SMCs um das 4,5 fache und von oxLDL konzentrationsabhängig stieg. Ecs und oxLDL zusammen steigerten die Aktivität des MIEP sogar um das 7,1 fache<sup>78</sup>. Weiterhin stellte man fest, dass es dem infizierten undifferenzierten Monozyten möglich war, CMV auf benachbarte Ecs oder SMCs zu übertragen<sup>13</sup>.

## 1.5.2 Einfluss von Viren der Herpesgruppe auf die Entstehung vaskulärer Erkrankungen

### 1.5.2.1 Tiermodelle

Die Induktion von chronischen vaskulären Erkrankungen durch Viren der Herpesgruppe im Tiermodell konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. So verursacht das  $\alpha$ -Herpesvirus Marek's disease virus (MDV) Arteriitis der großen Gefäße in Hühnern <sup>56</sup>, das  $\beta$ -Herpesvirus mCMV (mouse CMV) akute Arteriitis der großen Gefäße in Mäusen <sup>37</sup>, das  $\beta$ -Herpesvirus rCMV (ratCMV) Transplantatarteriosklerose in Ratten <sup>148</sup>, das  $\gamma$ -Herpesvirus mHV 68 (mouseHV) Arteriitis der großen Gefäße in IFN-Gamma knock-out-Mäusen <sup>211</sup>. Eine rCMV (ratCMV) Infektion erhöht die neointimale Akkumulation im Carotis-Verletzungs-Modell bei Ratten <sup>232</sup>, ein Mechanismus, der am Prozess der Restenosebildung maßgebend beteiligt ist.

### 1.5.2.2 Klinische Daten

HCMV wird seit langem mit verschiedenen Formen der Gefäßpathologie einschließlich der Transplantatabstoßung und der stenosierenden Transplantatsvaskulopathie <sup>107 71 180</sup>, der Restenose nach Ballonangioplastie <sup>186</sup> und der koronaren Atherektomie <sup>231</sup> und sogar mit nativen arterioskleritischen Läsionen <sup>129 86</sup> assoziiert. In neueren Studien wird ein Zusammenhang zwischen CMV-Infektion und kardialer Mortalität hergestellt. So konnte in einer Studie von Muhlestein et al CMV-Positivität als unabhängiger Risikofaktor für Mortalität bei Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung festgestellt werden. Der unabhängige Vorhersagewert von CMV-Positivität und erhöhtem CRP war in dieser Studie weitaus größer als eine Anzahl traditioneller Risikofaktoren wie Diabetes, Hyperlipidämie, Hypertension und Nikotinabusus <sup>136</sup>. In einer Studie von Blankenberg wird der prädiktive Wert von CMV bezüglich kardialer Mortalität bei Patienten mit erhöhten IL-6 Spiegel beschrieben <sup>15</sup>.

#### 1.5.2.2.1 Rolle des CMV bei der Transplantationsvaskulopathie

In der Transplantationsmedizin konnte gezeigt werden, dass hCMV bei Herztransplantierten eine Transplantationsarteriosklerose hervorruft<sup>106 107 112 219</sup>, die im Rattenmodell durch eine prophylaktische Gabe von DHPG - einem Thymidinanalogon - aufgehoben werden konnte<sup>113</sup>. Auch stellt hCMV mittlerweile den wichtigsten Risikofaktor einer Transplantatabstoßung innerhalb des ersten Jahres dar.

Erst kürzlich wurde in einer bisher noch nicht publizierten Studie am Deutschen Herzzentrum München der Zusammenhang einer akuten Infektion mit signifikant erhöhter hCMV-DNA bei immunsupprimierten Herztransplantierten mit dem Auftreten subintimaler Hyperplasie aufgezeigt.

#### 1.5.2.2.2 Rolle von hCMV bei der koronaren Restenose

hCMV ist nicht nur in den arteriosklerotischen Gefäßwänden und in Restenosepräparaten nachweisbar<sup>186 129</sup>. Seroepidemiologische Studien haben auch eine Assoziation zwischen CMV-Seropositivität und Arteriosklerose ergeben<sup>16 1236</sup>, sowie eine in Abhängigkeit von einer früheren hCMV-Infektion höhere Rate an nachfolgender Restenose trotz optimaler Atherektomie<sup>231</sup> und eine Verbindung zwischen einer früheren CMV-Infektion bei koronaren Angioplastiepatienten mit einer nachfolgenden Restenoseentwicklung<sup>186 231 16</sup>.

### 1.5.3 Molekularbiologische Mechanismen der Wirkung von CMV in der Restenose

In den letzten Jahren konnten beträchtliche Fortschritte in Bezug auf mögliche molekularbiologische Mechanismen der Wirkung des hCMV bei der Induktion einer Restenose erzielt werden. hCMV kann auf den eukaryonten Zellzyklus regulativ einwirken und fungiert als multipler Transaktivator verschiedenster Promotoren. Die Immediate Early Proteine IE1 und IE2 des hCMV haben bereits einige Interaktionen mit zellulären Mechanismen gezeigt, die auf eine ausgeprägte atherogene Potenz schließen lassen.



### 1.5.3.1 Einfluss auf oxidiertes LDL

HCMV vermag den zellulären Metabolismus so zu verändern, dass intra- und extracellulär Cholesterin und Cholesterylester akkumulieren<sup>56 82</sup>.

Ein erhöhtes Niveau an Plasma-LDL-Cholesterin führt zu einer gesteigerten Aufnahme von LDL in die Gefäßwand, in der es im subendothelialen Raum abgelagert wird. Dort wird es durch reaktive Oxygen-Intermediate und verschiedene zelluläre Enzyme oxidativ verändert<sup>143</sup>. Oxidiertes LDL (oxLDL) wird bevorzugt von Scavengerrezeptoren auf vaskulären SMC, Fibroblasten und Makrophagen in die Intima der Blutgefäße aufgenommen<sup>189</sup>. Dadurch werden Schaumzellen gebildet, die eine kritische Phase im Prozess der Arteriosklerose darstellen.

Eine hCMV-Infektion der SMC erhöht die zelluläre Aufnahme von oxLDL durch vermehrte Rezeptorexpression und Aktivitätssteigerung der Scavengerrezeptoren<sup>230</sup>. Zhou et al konnten bei hCMV infizierten SMCs von Ratten eine gesteigerte Aufnahme von oxLDL vermittelt durch das IE1-Protein feststellen. Das IE1-Protein des hCMV interagiert mit dem Klasse-A-Promotorrezeptor der Scavengerzellen, indem es dessen mRNA-Expression und die Aktivität des Promotors stimuliert<sup>230</sup>.

Einen zusätzlichen Mechanismus, über den hCMV die Expression der Scavengerrezeptoren erhöht, stellt die unten beschriebene Induktion des PDGF-Rezeptors durch IE-Gen-Produkte dar<sup>233</sup>. PDGF-BB kann ebenfalls die Scavengerrezeptoraktivität und mRNA-Expression erhöhen<sup>92</sup>.

Die Aufnahme von oxLDL und die konsekutive Umwandlung der Zellen in Schaumzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose.

OxLDL kann verschiedene Veränderungen in der zellulären Funktion bewirken, einschließlich der Induktion von wachstumsbeteiligten Genen wie der MAP-Kinase<sup>109</sup>, von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B<sup>124</sup> und AP1<sup>125</sup> sowie die Freigabe von Wachstumsfaktoren wie PDGF und FGF-1<sup>9</sup>. In SMCs ist die PDGF-Rezeptorexpression hochreguliert<sup>192</sup>, das ras ist aktiviert, die c-fos-Expression ist erhöht<sup>25</sup> und die Phospholipase D ist aktiviert<sup>138</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass oxLDL die DNA-Synthese und die Zellproliferation in vaskulären SMCs, Fibroblasten und Makrophagen stimuliert. Diese Effekte scheinen dosisabhängig zu sein: in niedrigen Konzentrationen stimuliert oxLDL die Zellproliferation, in hohen Konzentrationen erwies es sich als zytotoxisch<sup>10 14 26</sup>.

### 1.5.3.2 Inhibierung der Apoptose

Die Immediate Early Proteine IE1 und IE2 verhindern die Induktion der Apoptose durch den Tumornekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )<sup>234</sup>.

Nachdem hCMV in Restenoseläsionen, in denen große Mengen an p53 vorhanden waren<sup>186</sup>, nachgewiesen wurde, erfolgte die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen dem hCMV und dem für die Apoptose entscheidenden Protein p53. Mittlerweile unterstützen zahlreiche Studien den Verdacht, dass nach einer koronaren Intervention u.a. die Reaktivierung des latenten hCMV über eine p53 Inaktivierung zu einer Restenose führt<sup>185 186 51 200 18</sup>. Durch die Inaktivierung der apoptotischen Wirkung des p53 kann es zu einer gesteigerten Proliferation kommen. Dieser Mechanismus dürfte aber nicht der einzige sein :

In einer Studie von Zhu et al wurde beobachtet, dass E1A in menschlichen SAOS2 Zellen den Zelltod induzieren kann<sup>234</sup>. SAOS2-Zellen exprimieren kein p53, trotzdem vermochten IE1 und IE2 Zellen vor der durch das Adenovirus E1A-Protein induzierten Apoptose zu schützen. IE1, von dem keine Wirkung auf p53 beschrieben ist, blockierte E1A induzierte Apoptose sogar effizienter als IE2. Es muss also auch einen p53 unabhängigen Weg geben, über den IE1 und IE2 die Zellapoptose verhindern.

Neueren Erkenntnissen zufolge vermag eine hCMV-Infektion p53-unabhängig die Expression des extrazellulären Matrixproteins Thrombospondin-1, eines potenten Inhibitors der Angiogenese<sup>201</sup>, zu vermindern<sup>30</sup>. Diese Hemmung scheint in der Immediate-Early-Phase der Infektion zu erfolgen, so dass die IE-Genprodukte des hCMV verantwortlich sein könnten.

### 1.5.3.3 Signaltransduktionsweg

CMV verändert den intrazellulären Redoxstatus in SMC, wodurch der redox-sensitive NF- $\kappa$ B, aktiviert wird.

Bereits wenige Minuten nach der CMV-Infektion entstehen ROS- (=reactive oxygen species) Radikale, die ihren maximalen Level nach 1-2 h erreichen. Sie sind beteiligt bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B und werden vom Virus benützt, um dessen eigene Genexpression und Replikation zu erleichtern<sup>187</sup>.

Ein Pertussistoxin (PTx)-sensitiver G-Protein gekoppelter Signaltransduktionsweg vermittelt die zellulären Effekte der CMV-Infektion auf hSMCs. CMV bindet ein

Glycoprotein von 30 kDalton, wodurch das G-Protein aktiviert wird. Durch Phosphorylierung der mitogen-activated Proteinkinase (MAP-Kinase) durch die MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) aktiviert diese die cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>). Infolge dessen wird die Arachidonsäure (AA) Kaskade stimuliert und es entstehen intrazellulär freie Radikale. Diese wiederum aktivieren NF-κB<sup>176</sup>.

Es scheint also, dass hCMV einen der zelleigenen Signaltransduktionswege, die Arachidonsäurekaskade, die ursprünglich zum Schutz der Zelle bei Verletzung z.B. durch Bildung von ROS gedacht war, benützt, um die Expression seines eigenen genetischen Programms zu erleichtern.

#### 1.5.3.4 Aktivierung von NF-κB und Sp1

Eine hCMV-Infektion vermittelt über Glykoproteine einen initialen Signaltransduktionsweg, der zu einer Hochregulierung der Wirtszelltranskriptionsfaktoren wie NF-κB<sup>108</sup> und Sp1 führt<sup>225</sup>. Eine hCMV-Infektion bewirkt eine erhöhte Expressionsrate von Sp1-mRNA, Proteinen und DNA-Bindungsaktivität<sup>227</sup>. IE1 und IE2 sind an dieser Hochregulierung beteiligt<sup>226</sup>. IE1 und IE2 kooperieren mit Sp1, um die Promotertransaktivierung zu erhöhen und interagieren mit Sp1. Zusätzlich steigert IE2 die DNA-Bindung von Sp1, indem es möglicherweise inaktives Sp1 befreit. Sp1 wiederum spielt nach einer hCMV-Infektion eine Rolle bei der Regulierung der NF-κB-Promotorenuntereinheiten p65 und p105/p50<sup>225</sup>.

NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Gene induziert einschließlich derer, die verantwortlich sind für Entzündungs- und Immunantworten. Die Expression von NF-κB ist essentiell für die Proliferation von vaskulären SMCs von Rindern<sup>12</sup>.

#### 1.5.3.5 Einfluss auf Sekretion von Wachstumsfaktoren und Cytokinen

Die hCMV-Infektion wurde mit einer gesteigerten Cytokinproduktion assoziiert, direkt durch die infizierte Zelle und/oder indirekt durch Immunzellen, die mit infizierten Zellen interagieren<sup>76 169 171</sup>. Verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren werden

durch die CMV-Infektion stimuliert. Darunter Tumornekrose-Faktoren wie TNF- $\alpha$ , Interleukine wie IL-1 und IL-6, Interferone wie z.B. IFN- $\alpha$ , CC-Chemokine und CXC-Chemokine, die in Endothelzellen eine erhöhte transendotheliale Migration von Neutrophilen bewirken, Transforming growth factors wie TGF $\beta$ , das eine wichtige Rolle bei der Matrixproduktion spielt, angiogene Faktoren, z.B. gFGF, und hämatopoetische Wachstumsfaktoren (GM-CSF, G-CSF) <sup>31</sup>. Die Fähigkeit der IE-Genprodukte des hCMV, die Expression von PDGF- $\beta$ -Rezeptoren zu erhöhen, unterstreicht erneut die zentrale Rolle des hCMV im Prozess der Restenose bzw. In-Stent-Restenose <sup>233</sup>.

#### 1.5.3.6 Zelluläre Expression von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorisches Potential

Die Leukozytenadhäsion spielt für die Entstehung arteriosklerotischer Plaques insofern eine Rolle als Leukozyten in subendotheliale Bereiche migrieren und hier Mediatoren freisetzen. Eine ähnliche Rolle ist bei der Restenose anzunehmen.

In-vitro-Experimente haben gezeigt, dass das hCMV die Hochregulierung verschiedener Adhäsionsmoleküle wie das intrazelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und das Lymphozyten-Funktions-assoziierte Molekül-3 (LFA-3) induziert <sup>36 76 76 171 75</sup>.

Diese virusinduzierte Adhäsion erfolgt über einen CD18 glykoproteinabhängigen Mechanismus, den das Virus hochreguliert. Die Infektion der Endothelzellen induziert eine IL-1-Produktion. IL-1 verursacht eine Expression des endothelialen Leukozytenadhäsionsmolekül 1 (ELAM-1) auf der Oberfläche der Endothelzellen, welches den Liganden auf der Leukozytenmembran bindet <sup>183</sup>.

Des Weiteren wird das hCMV mit entzündlichen Veränderungen assoziiert. So gilt das Virus als einer der Hauptursachen für eine frühe Organabstoßung durch eine Transplantatarteritis. Es wird angenommen, dass das hCMV die Expression von Genen, die Proteine mit proinflammatorischer Aktivität codieren, verändern kann, wahrscheinlich ohne dass sich das Virus replizieren muss <sup>36</sup>.

### 1.5.3.7 Prokoagulatorische Veränderungen

Die Infektion von Endothelzellen mit verschiedenen Herpesviren verursacht prokoagulatorische Veränderungen<sup>205 52 154 75 183 54 207 184</sup>.

Aufgrund von verschiedenen Mechanismen besitzt das Endothel der Gefäße antithrombotische Eigenschaften. Einige wichtige sind die Fähigkeiten der Zellen, Heparinsulfat, Prostacyclin, Stickstoffoxid, Plasminogenaktivator und Thrombomodulin zu synthetisieren<sup>51</sup>. Diese antithrombotische Beschaffenheit stellt einen bedeutenden Schutz des Endothels vor Wandablagerungen dar, einem der mitbeteiligten Faktoren bei der Entstehung einer Restenose.

Das Cytomegalievirus und die Herpesviren HSV1 und HSV2 können eine Umwandlung des normalen antikoagulatorischen Zelltyps der Endothelzellen zu einem prokoagulatorischen Phänotyp bewirken<sup>207 205 52 204 53</sup>.

Eine Herpes-simplex-Infektion der Endothelzellen erhöht beispielsweise die Thrombinbildung auf der Zelloberfläche, sowie die Plättchenadhäsion und die Tissuefaktorsynthese der Endothelzellen signifikant<sup>207 100</sup>. Pryzdial und Wright stellten ebenfalls eine prokoagulatorische Veränderung durch eine Infektion mit dem Cytomegalievirus fest. Sie vermuten, dass die CMV Oberfläche das für den Koagulationskomplex notwendige prokoagulatorische Phospholipid enthält<sup>154</sup>.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Das Thema dieser Arbeit gilt der Untersuchung, ob und durch welchen Mechanismus eine Cytomegalieinfektion bzw. distinkte virale Genregionen des Cytomegalievirus zu einer Induktion des Zellzyklus in humanen koronaren glatten Muskelzellen führen, damit eine Zellproliferation induzieren und möglicherweise bei der Entstehung einer koronaren In-Stent-Restenose beteiligt sind.

Bekannt ist, dass Viren mit ihren Wirtszellen interferieren und in den Zellzyklus regulativ einwirken können. Bei der Frage welche Rolle eine Cytomegalieinfektion bei der Entstehung einer Restenose spielt, drängt sich die Vermutung auf, das Virus könnte auf die Zellzyklusregulation modulierend einwirken und so eine Proliferation der CSMCs bewirken. Der Zellzyklus spielt aufgrund seiner zentralen Rolle bei Zellwachstum und Zellteilung eine Schlüsselfigur bei der Pathogenese der koronaren Restenose und ist deshalb ein innovativer Ansatzpunkt für pathomechanistische und

therapeutische wissenschaftliche Untersuchungen. Die Frage einer Zellzyklusregulation von humanen koronaren glatten Muskelzellen durch hCMV war bisher kein Thema einer Studie.

Im Rahmen dieser Arbeit soll auf zellulärer und molekularer Ebene der Einfluss des Virus und seiner Genprodukte IE1 und IE2 auf den Zellzyklus untersucht werden, um eine Proliferation der CSMCs zu akquirieren. Es wurde weiterhin untersucht, ob die Überexpression der Immediate Early Gene allein im Stande war, den Zellzyklus zu beeinflussen. Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, durch eine Überexpression der Immediate Early Gene IE1 und IE2 auf CSMCs gegebenenfalls molekulare Mechanismen bei der Virus-Zellzyklus-Interaktion aufzudecken.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Klonierung

#### 2.1.1 Material

##### 2.1.1.1 Plasmide

PHM 135= pCMV IE1: 6,7 kb (Prof Dr. med Thomas Stamminger, Institut für klinische und molekulare Virologie, Universität Erlangen-Nürnberg)

Vektor: pHM 124: 5,2 kb

Insert: IE1 cDNA: 1,5 kb

Ausgeschnitten mit Apa I / Eco RI

PHM 134= pCMV IE2: 7,2 kb (Prof Dr. med Thomas Stamminger, Institut für klinische und molekulare Virologie, Universität Erlangen-Nürnberg)

Vektor: pHM 120: 5,2 kb

Insert: IE2 cDNA: 2 kb

Ausgeschnitten mit Apa I / Eco RI

pBS II SK(+/-) IE1 4,4 kb

Vektor: pBluescript<sup>R</sup> II SK(+/-): 2,96 kb: (Stratagene, # 212205)

Insert: IE1 cDNA: 1,5 kb

Kloniert mit Apa I / Eco RI

pBS II SK(+/-) IE2 4,9 kb

Vektor: pBluescript<sup>R</sup> II SK(+/-): 2,96 kb: (Stratagene, # 212205)

Insert: IE2 cDNA: 2 kb

Kloniert mit Apa I / Eco RI

adenoviraler Shuttlevektor

pAcCMV SR(-): 8,8 kb

pAcCMV SR(-) IE1: 10,3 kb

Vektor: pAcCMV SR(-): 8,8 kb

Insert: IE1 cDNA: 1,5 kb

Kloniert mit Xba / Kpn I

pAcCMV SR(-) IE2: 10,8 kb

Vektor: pAcCMV SR(-): 8,8 kb

Insert: IE2 cDNA: 2 kb

Kloniert mit Xba / Kpn I

E1A-defizienter adenoviraler DNA-Vektor

pJM 17: 9 kb

Kontrollverdau mit Hind III

Fragmente: 2 kb, 3 kb, 4 kb

PON:  $\beta$ -Galaktosidase: 7,2 kb

Kontrollverdau mit KpnI/ ClaI

Fragmente: 1 kb, 1,2 kb, 5 kb

PUC 19 DNA: 2,686 kb (Gibco BRL; # 18258-012)

#### 2.1.1.2 Enzyme

Restriktionsendonucleasen (Boehringer Mannheim)

T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim; # 481 220)

#### 2.1.1.3 Längenstandard

1 Kb DNA Ladder (Gibco BRL; # 15615-016)

Menge für 500  $\mu$ l Marker:

350  $\mu$ l TE-Puffer wurde mit 100  $\mu$ l 5x-TBE-Puffer (Gel loading buffer) und 50  $\mu$ l 1 kb DNA-Ladder vermischt. Pro Gel wurden 12  $\mu$ l geladen

#### 2.1.1.4 Puffer

TE-Puffer: (Tris/EDTA-Puffer): 10 mM Tris/ 1 mM EDTA

0,06 g Tris wurde in 45 ml ddH<sub>2</sub>O aufgelöst, der pH mit HCl auf 7,5-8 kallibriert, 0,4 ml 100 mM EDTA zugegeben und mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt.

Probenpuffer: Hi Density TBE Sample Buffer (NOVEX; # 6678)

#### 2.1.1.5 Bakterien

kompetente E. coli Zellen DH5 $\alpha$  (Gibco BRL; # 18258-012)



XL1-Blue MRF' von Stratagene

#### 2.1.1.6 Kulturmedien

Luria-Bertani Medium (LB-Medium)

Es wurden 10 g Bacto-Tryptone (Difco, # 0123-01-1), 5 g Hefe und 10 g NaCl ad 1000 g ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert.

Agar:

Es wurden 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Hefe, 10 g NaCl und 10 g Agarose (Sigma; # 05068) ad 1000 g ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert.

#### 2.1.1.7 Platten

Herstellung von Agarplatten:

Der zuvor autoklavierte Agar wurde in der Mikrowelle erhitzt. In einem 55°C Wasserbad wurde der nun flüssige Agar abgekühlt und Ampicillin (50mg/ml) zugegeben. Pro Agarplatte wurden ca. 20-30 ml flüssiger Agar eingefüllt.

### 2.1.2 Methoden

#### 2.1.2.1 Restriktionsverdau von Plasmiden

Der Verdau von Vektoren wurde mittels Restriktionsendonukleasen (Boehringer Mannheim) in 0,5 ml Eppendorfcups durchgeführt. Als Puffer wurden die jeweils von der Firma empfohlenen Puffer eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt 1 µl DNA mit  $c = 1 \text{ g}/\mu\text{l}$ , 1 µl Restriktionsenzym und 1 µl Puffer ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O. Der Ansatz wurde 60-120 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 5xTBE wurde der Restriktionsverdau gestoppt und für die Elektrophorese mit Marker gefärbt.

#### 2.1.2.2 1% iges Agarosegel für Gelelektrophorese

Als Puffer wurde 10xTBE-Puffer verwendet, der mit ddH<sub>2</sub>O auf 1x verdünnt wurde. Für 100 ml Agarosegel wurde 1 g Agarose in einen 200 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 1xTBE-Puffer auf 100 g aufgefüllt. Die Suspension wurde mehrmals in einem Mikrowellenherd aufgekocht und geschwenkt, bis die Agarose

vollständig gelöst war. Ein auf den Erlmayerkolben gelegtes Uhrglas verhinderte das Verdampfen. Erst kurz vor dem Gießen wurden 2,5 µl Ethidiumbromid zugegeben.

#### 2.1.2.3 Gelelektrophorese

Gesuchte DNA-Fragmente werden über ein präparatives Agarosegel von den übrigen Fragmenten entsprechend ihrer Größe getrennt.

Elektrophoresen wurden bei 20 mV begonnen, bis der Inhalt der Kammern gleichmäßig in das Gel gewandert war, dann wurde die Elektrophorese mit 100-160 V (40-80 mA) fortgesetzt.

Als DNA-Längenstandart diente 1 kb DNA-Ladder (Gibco BRL).

#### 2.1.2.4 DNA Eluation aus dem Agarose Gel

Die Eluation der DNA aus Agarose erfolgte mit dem Agarose Gel DNA Extraktion Kit (Boehringer Mannheim; # 1696505).

Die gesuchten DNA-Fragmente wurden sorgfältig mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und jeweils in 1,5 ml Eppendorfröhrchen gegeben. Die gefüllten Röhrchen wurden bei 4°C über Nacht im Kühlschrank gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Pro 100 mg Agarose wurden 300 µl Agaroselösungspuffer zugegeben. Die Röhrchen wurden ca. 30 sek gevortext. Die Silika-Matrix wurde solange gevortext, bis sich eine homogene Mischung gebildet hatte und 10 µl der Silika-Suspension wurden der Probe zugegeben. Die Mischung wurde 10 min bei 56-60°C inkubiert und alle 2-3 min gevortext. Nach Zentrifugieren der Probe bei 10.000 rpm für 30 sek wurde der Überstand verworfen. Das die DNA enthaltende Pellet wurde mit 500 µl Nukleinsäurebindungspuffer gevortext, dann zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl Waschpuffer resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Um die im Pellet befindliche DNA zu trocknen, wurde die verbleibende Flüssigkeit mit einer Pipette entfernt und das Reaktionsgefäß umgedreht auf ein Papierhandtuch gestellt. Das getrocknete Pellet hat eine weiße Farbe. Um die DNA mit TE-Puffer aus dem Pellet zu lösen, wurde das Pellet mit 8 µl TE-Puffer resuspendiert und 10 min bei 56-60°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand, der die DNA enthielt, in ein 0,5 ml Eppendorfröhrchen gegeben. Dieser Schritt wurde mit 6 µl TE-Puffer wiederholt.

Die Qualität der eluierten DNA wurde in einem Agarosegel geprüft. Als Probe wurden 2 µl Eluat, 6 µl ddH<sub>2</sub>O und 2 µl 5xTBE Gelladepuffer eingesetzt.

#### 2.1.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligationsreaktion wurde durch die T4-Ligase (Boehringer Mannheim, # 481220) katalysiert. Die Ligation wurde bei 16°C in einem Wasserbehälter über Nacht durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 10-20 µl. Dabei wurden Vektor und Insert, die vorher aus Agarosegel isoliert wurden, in verschiedenen Reaktionsansätzen im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt. 10% des Gesamtvolumens entfiel auf die T4-Ligase. Vor Zugabe von Enzym und 1x Ligase-Buffer wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 45-55°C inkubiert.

#### 2.1.2.6 Transformation von DH5α kompetenten E.coli Zellen mit Plasmid-DNA

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente E. coli Zellen auf Eis 10 min aufgetaut. 10-100 ng DNA wurden in einem Volumen zwischen 1-3 µl hinzugefügt. Als positive Kontrolle wurde pUC 19 verwendet. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min und anschließend ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 30 sek. Die Proben wurden für 2 min auf Eis gelegt, 950 µl steriles LB-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37°C mit 200 rpm geschüttelt. Daraufhin folgte eine Zentrifugation bei 950 rpm für 5 min. Nach Abnehmen und Verwerfen von 750 µl des Überstandes und Resuspendieren des Pellets in dem restlichen Medium wurden 100 µl pro Ansatz auf vorgewärmte Ampicillin Platten (50 mg/l) ausplattiert und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert.

#### 2.1.2.7 Isolierung von DNA aus Bakterienzellen und DNA-Preparation

Vorkulturen für die DNA Präparation:

Die nach der Transformation auf selektiven Platten gewachsenen Kolonien wurden vermehrt. Dazu wurde für jede zu untersuchende Kolonie ein Glasröhrchen mit 2 ml LB-Medium mit Ampicillin 50 mg/l gefüllt. Mit auoklavierten Zahnstochern und im Bunsenbrenner ausgeglühter Pinzette wurde die Kolonie gepickt und zusammen mit dem Zahnstocher in das Röhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden mit einem

luftdurchlässigen Deckel verschlossen und über Nacht bei 37°C mit 225 rpm geschüttelt.

DNA-Präparation mit dem S.n.A.P. Miniprep Kit (Invitrogen Version C; # K 1900-01):  
Im ersten Schritt wurde die Bakterienwand lysiert und Proteine werden präzipitiert. Der über Nacht inkubierten Vorkultur wurde 1 ml entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorfcup mit 10000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl Resuspension Buffer resuspendiert. Dem Ansatz wurden weitere 50 µl Resuspension Buffer zugegeben. 150 µl Lysis Buffer wurde hinzugefügt und die Proben wurden vorsichtig gemischt, indem die Reaktionsgefäße 6 mal um die Horizontale gedreht und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Proteine wurden durch Hinzufügen von 150 µl Precipitation Salt ausgefällt. Die Proben wurden wieder 6 mal gedreht und bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Im zweiten Schritt wurden die Plasmide an eine Säule gebunden und gereinigt. Dem in ein steriles Eppendorfggefäß überführten Überstand wurde 600 µl Binding Buffer zugegeben. Nach 6 maligem Umwenden der Eppendorfcups wurde die Lösung in die Säule geschüttet und bei 13000 rpm 30 sek zentrifugiert. Ein Waschschrift erfolgt mit 500 µl Wash Buffer. Nach erneutem Zentrifugieren wurde 900 µl 1x Final Wash Buffer in die Säule pipettiert. Danach wurde die Säule bei Maximalgeschwindigkeit trocken zentrifugiert.

Im dritten Schritt erfolgte die Plasmideluation aus der Säule. Das Oberteil der Säule wurde auf ein Eppendorfggefäß mit abgeschnittenem Deckel gesteckt und mit 60 µl TE-Buffer 3 min inkubiert. Plasmidhaltiger TE-Puffer wurde bei 13000 rpm in das Eppendorfcup abzentrifugiert.

Der Erfolg der DNA-Präparation wurde durch einen Restriktionsverdau des Plasmids und anschließender Analyse der erhaltenen Fragmente im Agarosegel überprüft.

Vorkultur für Maxiprep:

In einen mit Alufolie abgedeckten und autoklavierten 500 ml Erlmayerkolben wurden 250 ml LB-Medium (Ampicillin 50 mg/ml) gefüllt und 0,5 ml der Vorkultur des entsprechenden Miniprep dazugegeben. Die Erlmayerkolben wurden wieder mit ihrer Alufolie bedeckt und über Nacht bei 37°C mit 200 rpm geschüttelt.

DNA-Präparation mit Maxiprep Kit Qiagen Plasmid Purification ( Qiagen; # 12163):  
Die Vorkultur wurde mit 5000 rpm 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde beseitigt und das Bakterienpellet mit 10 ml P1 resuspendiert. Die Bakterienwand wurde mit 10 ml P2 lysiert. Nach vorsichtigem Mischen durch 46 maliges Umdrehen der Flasche wurde das Gemisch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde 10 ml eisgekühltes P3 zugegeben und sofort vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wurde für 30 min bei 4°C mit 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der Plasmid enthält, wurde mit serologischen Pipetten abgenommen und erneut bei 10 000 rpm 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem 50 ml Falcon bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die im Kit mitgelieferten Säulen wurden nun über frischen 50 ml Falkons fixiert. Eine Equilibrierung der Säulen erfolgte mit 10 ml QBT-Buffer. Nachdem der plasmidhaltige Überstand durch die Säule gelaufen war und die DNA an die Säule gebunden war, folgte ein Waschschrift mit zweimal 30 ml QC. Um die DNA aus der Säule zu eluieren, wurde sie auf ein frisches Zentrifugenröhrchen gesetzt und 5 ml QF zugegeben. Die im Eluat enthaltene DNA wurde nun durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugieren mit 10 500 rpm 30 min bei 4°C wurde der Überstand, ohne das Pellet dabei aufzulösen, weggeschüttet. Die Reinigung der DNA erfolgte durch Zugabe von 5 ml 70% Ethanol und anschließendes Zentrifugieren bei 10 500 rpm für 10 min. Das plasmidhaltige Pellet wurde 5-10 min bei Raumtemperatur kopfüber auf ein Papier gestellt getrocknet. Das Pellet wurde in 120 µl TE-Puffer aufgelöst und in Eppendorfcups aufbewahrt.

#### 2.1.2.8 Photometrische Quantifizierung von DNA

Die photometrische DNA-Quantifizierung erfolgte mit dem Photometer bei 260 nm und 280 nm nach folgenden Formeln:

DNA-Konzentration [ng/µl] = Dilutionsfaktor D x Ausgleichsfaktor (dsDNA: 50 µg/ml)  
x Extinktionswert (260 nm)

DNA-Reinheit: Extinktion A 260 nm / Extinktion 280 nm >1,7-1,8

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Material

#### 2.2.1.1 Chemikalien und Lösungen

PBS (Sigma)

Trypsin EDTA (Sigma)

Citrate Saline

Isopropanol (Sigma)

3,7% Formalin

HBS ( HEPES buffered saline)

FCS ( fetales Kälberserum; Gibco)

Hitze inaktiviertes FCS

Glutamin (Gibco)

Penicillin/ Streptomycin (Clonetics)

Ciprobay

#### 2.2.1.2 Kulturmedien

Freezing –Medium (Gibco; # 11101)

DMEM-Medium (Gibco)

SmBm-Medium (Clonetics; # CC-3181)

CASMC-Zusatzkit mit Wachstumsfaktoren (SmGM-2 BulletKit, Clonetics; # CC-3182)

Kit zum Zellen splitten

Splitting Kit mit Trypsin/EDTA (T/E) ( Clonetics; # CC-5012), HEPES-Buffered Saline Solution (HEPES-BSS) und Trypsin Neutralizing Solution (TNS) (Clonetics; # CC-5002)

Fungizone

#### 2.2.1.3 Zellen

293 (HEK)-Zellen

Als Medium wurde 500ml DMEM-Medium (Gibco) verwendet, dem 50ml hitzeinaktiviertes FCS (Gibco), 5ml Glutamin (Gibco) und 5ml Penicillin (1000IE/ml)/Streptomycin (10mg/ml) hinzugefügt worden waren.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% im Verhältnis 1:3 gesplittet. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten bis vierten Tag.

CASMC (humane koronare glatte Muskelzellen; Clonetics)

Als Medium wurde 500 ml SmBM-Medium (Clonetics) verwendet, dem die Wachstumsfaktoren 0,5 µg/ml hEGF (human recombinant Epidermal Growth Factor) 0,5 ml, 1 µg/ml hFGF (human recombinant Fibroblast Growth Factor) 1 ml und 5 mg/ml Insulin 0,5 ml sowie 25 ml hitzeinaktiviertes FCS, 0,5 ml 50 mg/ml Gentamycin und 50 µg/ml Amphotericin-B hinzugefügt worden waren (SmGM-2 BulletKit, Clonetics; # CC-3182).

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% im Verhältnis 1:3 gesplittet. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

NH3T3 (Mäusefibroblasten)

Als Medium wurde 500 ml DMEM-Medium (Gibco) verwendet, dem 50 ml hitzeinaktiviertes FCS (Gibco), 5 ml Glutamin (Gibco) und 5 ml Penicillin (1000 IE/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) hinzugefügt worden waren.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% im Verhältnis 1:3 gesplittet. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag.

HFF (humane Vorhautfibroblasten)

Als Medium wurde 500 ml DMEM-Medium (Gibco) verwendet, dem 50 ml hitzeinaktiviertes FCS (Gibco), 5 ml Glutamin (Gibco), 5 ml Penicillin (1000 IE/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) und 2,5 ml Ciprobay hinzugefügt worden waren.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% im Verhältnis 1:3 gesplittet. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag.

## **2.2.2 Methoden**

### **2.2.2.1 Zellpassagierung**

HFF und NH3T3-Zellen:

Nach Absaugen des Mediums aus den 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Sarstedt) wurden die Zellkulturflaschen zweimal mit 10 ml PBS (Sigma) gespült. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA (Sigma) wurden die Zellen vom Flaschenboden enzymatisch innerhalb von etwa 3min im Wärmeschrank abgelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurden 9

ml Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Falkons bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Mediums wurden die Zellen in 3 ml frischen Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 auf neue mit 10 ml Medium gefüllte Kulturflaschen verteilt. Um einen gleichmäßigen Zellrasen zu erzielen, wurden die Flaschen vor der Bebrütung im Wärmeschrank achterförmig geschwenkt.

#### CASMC-Zellen

Für die Zellpassagierung der CASMCs wurde das CASMC Splittingset von Clonetics mit Trypsin/EDTA (T/E), HEPES-Buffered Saline Solution (HEPES-BSS) und Trypsin Neutralizing Solution (TNS) verwendet. Die CASMCs wurden bei der Zellpassagierung vor Zugabe der Trypsinlösung zweimal mit HEPES-BSS gewaschen. Zur enzymatischen Zellablösung wurden 3 ml T/E verwendet. Inaktivierung des Enzyms erfolgte mit 3 ml TNS.

#### 293 Zellen

Zur Zellpassagierung der 293 Zellen wurde statt Trypsin 10 x Citrate Saline verwendet. Dafür wurden 50 g KCl ( Merck, # TA 194536-6350) und 22 g Natriumcitrat ( Sigma,# S-4641) ad 500 ml H<sub>2</sub>O gegeben und sterilfiltriert.

#### 2.2.2.2 Zellagerung

Die Zellagerung erfolgte bei -190°C im Stickstofftank. Zum Einfrieren der Zellen wurden sie mit Freezing-Medium ( Gibco, # 11101) resuspendiert und im Verhältnis 1:1 auf Einfrierröhrchen verteilt. Zur Zellschohnung wurden die Zellen zuerst für einen Tag in einer mit Isopropanol gefüllten Cryovials ( Nalgene) bei -70°C gelagert und erst danach in den Stickstofftank gegeben.

#### 2.2.2.3 Zellzählung in der Neubauerkammer

Nachdem die Neubauerkammer mit der Zellsuspension gefüllt worden war, wurde der Mittelwert der in den vier Quadranten gezählten Zellen errechnet. Da ein Quadrant 0,1 µl enthält, konnte die Zellkonzentration nach folgender Formel errechnet werden: Mittelwert x 10.000 x Volumen der Zellsuspension [ml] = Konzentration [Zellen/ml]



## 2.3 Zellarretierung mittels FCS Entzug

Auf zwei 6 Well-Platten wurden 40 000 CASMCs pro Well ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70% wurde mit einer schrittweisen Serumreduzierung begonnen. Der FCS Anteil wurde zuerst von 5% auf 1,5% reduziert. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt und für 48 h ein Medium ohne FCS Anteil aufgetragen. Alle 12 h wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und ihr Zustand photographisch festgehalten.

## 2.4 Herstellung rekombinanter Adenoviren

### 2.4.1 Material

293 Medium mit 4% FCS:

Als Medium wurde 470 ml DMEM-Medium (Gibco) verwendet, dem 20 ml hitzeinaktiviertes FCS (Gibco), 5 ml Glutamin (Gibco) und 5 ml Penicillin (1000 IE/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) hinzugefügt worden waren.

2 M  $\text{CaCl}_2$  (73,5 g  $\text{CaCl}_2$  ad 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0) wurde mit einem 0,22  $\mu\text{m}$  Nitrozellulosefilter filtersterilisiert und in kleinen Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

HEPES-buffered saline: HBS

280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES; entspr.: 3.27 g NaCl, 0.15 g KCl, 0.043 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.624 g Dextran, 2.38 g HEPES ad 180 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7.05; ad 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ;

HBS wurde filtersterilisiert und in kleinen Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.4.2 Kalziumphosphat Transfektion nach Graham

Zusammen mit der entsprechenden DNA werden  $\text{CaCl}_2$  und HEPES-buffered Saline (HBS) unter genauen Bedingungen (pH 7,05) miteinander gemischt. Es entsteht eine Suspension von unlöslichem Kalziumphosphat, an das sich die DNA bindet. Nach einer halben Stunde werden die gebildeten Kalziumphosphat-DNA-Kristalle auf die

Zellen gegeben. Die Kristalle setzen sich auf der Zelloberfläche ab und werden durch Endozytose in die Zellen aufgenommen. Die DNA gelangt in den Zellkern, wo sie transkribiert wird.

Die 293 Zellen wurden in 60 mm<sup>2</sup> Schälchen (Falcon Labware; # 3802) so ausplattiert, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 80% erreichten. Am folgenden Tag wurde eine Stunde vor Transfektion das Medium erneuert und für 1 h bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Während der Inkubation erfolgte eine Vorbereitung der Transfektionsproben:

152 µl dd H<sub>2</sub>O, 5 µl des Plasmids PJM 17, 5µl des adenoviralen Shuttlevektors pAcCMV SR (-) IE1 bzw. IE2, 18 µl CaCl<sub>2</sub> (2M) und 180 µl 2 x HBS (pH 7,05) wurden vorsichtig durch 30 maliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Ansätze wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 334 µl tropfenweise mit einer 200 µl Pipette gleichmäßig pro Platte aufgetragen und durch Schwenken in Achterform mit dem Medium vermischt. Hierauf wurden die Platten für 6-12 h im Wärmeschrank bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.4.3 Abdeckung der transfizierten Zellen mit Agarüberzug**

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 3 ml 1,2% Agarose (Sigma) gemischt im gleichen Volumen mit 2xDMEM (Gibco) überdeckt. Hierfür wurde autoklavierter 1,2% Agar in der Mikrowelle erhitzt, ca. 30 min. zusammen mit der gleichen Menge 2xDMEM Gemisches im Wasserbad auf 55°C abgekühlt, unter der Sterilbank vermischt und anschließend bei einer Mediumtemperatur von ca. 37°C auf die Zellen gegeben. Alle 3-4 Tage wurden 2-3 ml des Agar/ 2xDMEM Gemisches hinzugefügt. Ab dem 9. Tag konnten bei erfolgreicher Transfektion durch Hinzufügen von 1% Neutral Red Lösung (Merck, # 1.01376) zum Agar die entstandenen Plaques als Löcher im Zellrasen sichtbar gemacht oder im Gegenlicht als runde Aufhellungen im Zellrasen erkannt werden.

### **2.4.4 Plaquaufreinigung**

Die entstandenen Plaques wurden mit 1000 µl Pipettenspitzen, deren Spitze mit einer sterilen Schere abgeschnitten waren, um den Durchmesser zu vergrößern, als

Agarblock ausgestochen und wurden mit 293 Medium in 1,5 ml Eppendorfröhrchen gefüllt bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **2.4.5 Virusnachweis und erste Viruspropagierung**

Zur Feststellung des Virusgehalts eines Plaques wurden 293 Zellen in 6 Wellplatten ausplattiert und mit virushaltigem Medium versehen. Die Infektion von Zellen konnte am zytopathischen Effekt erkannt werden. Infizierte Zellen werden ödematös, bilden Vakuolen im Zytoplasma, runden sich ab und lösen sich vom Plattenboden.

Die Plaques wurden zwei mal auf Eis aufgetaut und wieder eingefroren. Diese Maßnahme diente dazu, die Zellwände aufzubrechen, um so eine höhere Virusaussbeute zu erhalten. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 3 min wurden pro Schale 400  $\mu\text{l}$  plaquehaltiges Medium und 600  $\mu\text{l}$  frisches Medium eingesetzt. An virusinfizierten Zellen konnte nach ein bis drei Tagen der zytopathische Effekt beobachtet werden.

Wenn der zytopathische Effekt etwa 50% der Zellen erfasst hatte, wurden die Zellen mit einem Zellabkratzer vom Plattenboden abgelöst und die Medium-Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Erst nach dreimaligem Auftauen und Einfrieren wurde das virushaltige Medium zur weiteren Infektion verwendet.

#### **2.4.6 Viruspropagierung und Herstellung eines Large Scale Prep**

Infiziert wurden zu 80% konfluente 293 Zellen in 75  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen. Nach Entfernen des Mediums wurden 100  $\mu\text{l}$  des zuvor erhaltenen Virus-Medium-Gemisches und 900  $\mu\text{l}$  frisches Medium zugegeben. Durch Schwenken der Flaschen wurde die Flüssigkeit gleichmäßig über dem Zellrasen verteilt. Um eine große Infektionsrate zu erzielen, wurden zur Infektion möglichst kleine Volumina verwendet. Die Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  1 h inkubiert und dabei alle 10 min geschwenkt. Nach einer Stunde wurden 8 ml 293 Medium hinzugegeben. Der zytopathische Effekt stellte sich nach 12-36 h ein.

Nachdem bei 50% der Zellen ein zytopathischer Effekt aufgetreten war, wurden die Zellkulturflaschen bei -70°C eingefroren. Nach dreimaligem Auftauen und Einfrieren wurden die Zellen mit einem Zellkratzer vom Flaschenboden abgelöst und die Zell-Medium-Suspension in 500 µl Portionen in Kryoröhrchen bei -70°C gelagert.

#### **2.4.7 Titerbestimmung des Large Scale Prep durch Plaque forming assay**

Zur Titerbestimmung wurden 293 Zellen mit verschiedenen Viruskonzentrationen infiziert und mit 2xDMEM (Gibco) Agarose-Medium Overlay bedeckt. An Hand der Anzahl der auftretenden Plaques, der verwendeten Virusverdünnung und des zur Infektion eingesetzten Volumens konnte der Virustiter errechnet werden.

Zur Infektion wurde Virus aus dem LSP verwendet. Um Zelldetritus aus der Viruslösung zu entfernen, wurde bei 5000 rpm für 3 min zentrifugiert. Infiziert wurden sechs mit je 400 000 Zellen ausplattierte 60 mm<sup>2</sup> Platten.

Vom Virus wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Verdünnt wurde jeweils 1:10 bis 1:10<sup>8</sup>. Die Zellen wurden mit einem Volumen von 300 µl in den Verdünnungen von 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> infiziert. Die sechste Platte diente als Kontrolle und wurde mit virusfreiem Medium inkubiert. Sieben Tage nach dem Aufbringen des Agar-Medium-Overlays konnten die Plaques ausgezählt werden. Der Virustiter errechnete sich nach folgender Formel:

$$C \text{ [PFU/ml]} = \text{Plaqueanzahl} \times 1000 / 300 \text{ µl} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Virustiter wurde in der Einheit PFU (plaqueforming units)/ml angegeben.

#### **2.5 Propagierung des hCMV in HFF Zellen**

HFF Zellen wurden in 175 mm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gezogen und bei einer Konfluenz von 80% mit 1 ml der hCMV Lösung infiziert. Entsprechend der Propagierung der Adenoviren wurden die Zellkulturflaschen alle 10 min geschwenkt, um eine Austrocknung der Zellen zu vermeiden. Nach einer Stunde Inkubation wurden den Flaschen 15 ml HFF Medium zugefügt. Der zytopathische Effekt trat nach 12-24 h ein. Das Ernten des Virus wurde durchgeführt, nachdem bei der Hälfte der infizierten Zellen mikroskopisch ein zytopathischer Effekt nachweisbar war. Dies war meist nach 24 h erreicht. Das Ernten erfolgte, wie unter 4.7.5. bereits beschrieben, durch

mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Zellen, um die Zellwände aufzubrechen. Die Zellen wurden mit einem Zellkratzer vom Flaschenboden abgelöst und jeweils 500 µl der Zell-Virus-Medium-Suspension in Kryoröhrchen abgefüllt. Die Suspension wurde bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.5.1 Titerbestimmung des propagierten hCMV**

Analog zur Titerbestimmung des Adenovirus erfolgte eine Infektion von HFF Zellen mit einer Verdünnungsreihe des geernteten Virus. Nach drei Wochen wurde anhand der gezählten Plaques der Titer bestimmt.

## **2.6 Proteingewinnung infizierter CASMCs mit Adenovirus IE1 bzw. IE2**

### **2.6.1 Infektion der Zellen für die Proteingewinnung**

Die Proteinisolierung erfolgte zu drei Zeiten:

Es wurden 13 Platten mit 3,5 cm Durchmesser mit 280 000 CASMCs pro Platte vorbereitet. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70% durch schrittweisen FCS Entzug arretiert ( siehe 2.3.).

Zum Zeitpunkt  $t=0$  h erfolgte die Infektion der 13 CASMC Platten: drei Platten wurden mit Ad-IE1 mit einer MOI von 10 infiziert, drei Platten mit Ad-IE2 mit einer MOI von 10, drei Platten mit Ad- $\beta$ Gal in einer MOI von 10. Als Positivkontrolle wurden drei Platten mit 10 ng/ml PDGF stimuliert, als Negativkontrolle eine Platte CASMCs serumfrei inkubiert. Zum Zeitpunkt  $t=24$  h erfolgte die erste Proteinisolierung einer Ad-IE1 Platte, einer Ad-IE2 Platte, einer Ad- $\beta$ Gal Platte und einer PDGF stimulierten Platte. Zum Zeitpunkt  $t=48$  h erfolgte die Proteinisolierung einer Ad-IE1 Platte, einer Ad-IE2 Platte, einer Ad- $\beta$ Gal Platte und einer PDGF stimulierten Platte. Zum Zeitpunkt  $t=72$  h erfolgte die Proteinisolierung einer Ad-IE1 Platte, einer Ad-IE2 Platte, einer Ad- $\beta$ Gal Platte, einer PDGF stimulierten Platte und einer nicht stimulierten CASMC Platte als Negativkontrolle.

## 2.6.2 Proteingewinnung

### 2.6.2.1 Material

CASMC

NTE-Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH 7,4

NP40 10%tig (Sigma; # N 6507)

Glycerol 80%tig (Sigma; # G 9012)

### 2.6.2.2 Proteingewinnung

Wenn der zytopathische Effekt mehr als 50% der Zellen erfasst hatte, wurden die Zellen mit Zellkratzern vom Flaschenboden gelöst und zusammen mit ihrem Medium in 10 ml Falkons bei 1000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 0,5 ml NTE-Puffer resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Zugabe von 25 µl des 10%tigen Detergents NP40 lysierte die Zellwand. Nachdem die Probe für 30 sec gevortext worden war, wurde mit 14 000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde mit 80% Glycerol 1:10 verdünnt und bei -70°C gelagert.

## 2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels Bradford Assay

Durch einen Bradford Assay (Biorad) wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt: Als Standard wurde Albumin in PBS 1,28 mg/ml, 0,64 mg/ml, 0,32 mg/ml, 0,16 mg/ml und 0,08 mg/ml verwendet. Es wurden je 5 µl Standards und nachfolgend die zu bestimmenden Proben in eine 96 Well-Platte pipettiert, 25 µl Reagenz A und 200 µl Reagenz B dazu gegeben und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte am Elisameter mit einer Wellenlänge von 750nm.

## 2.7 Western Blot

### 2.7.1 Material

Gelkammer: Xcell II Mini-Cell and Blot Module (NOVEX; # EI 9001)

Blotpad (NOVEX; # EI 9052)

Novex Gel: 4-20% TAE-Gel(# EC 6025), 4-12%TAE-Gel(# EC6035)

Immun Star Anti-Mouse Detection Kit (Biorad)

Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology; # sc-2048)

Proteinstandart: Kaleidoscope Prestained Standarts (Biorad; #74815)

Marker: Kaleidoscope Protein Standard (Biorad;# 161-0324)

Nitrocellulosemembran: Hybond C extra (Amersham; # 71720-31)

Filterpapier

Frischhaltefolie

Fotokassette

Film: X-OMAT (Kodak)

-Primäre Antikörper

Mouse Anti-CMV protein IE72 monoclonal antibody ( Vancouver Biotech, # G13-6E1)  
1:500

Mouse Anti-CMV protein IE84 monoclonal antibody ( Vancouver Biotech, # G13-12E2) 1:500

Cdk 4 Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology,# sc-260-G) 1:500

Cdk 2 Maus (Santa Cruz Biotechnology, # sc-6248) 1:500

Mouse Anti-Actin, smooth muscle monoclonal Antibody 1:333 (Chemicon International Inc., # MAB 1522)

Cyclin D1 Maus 1:500 (Santa Cruz Biotechnology,# sc-6281)

PCNA Maus 1:500 (Santa Cruz Biotechnology,# sc-56)

-Sekundäre Antikörper

Goat-anti-mouse Ig-HRP conjugated ( Santa Cruz Biotechnology, # sc-2004) 1:5000

Donkey-anti-rabbit-Ig-HRP conjugated (Santa Cruz Biotechnology, #sc-2313) 1:5000

Positiv Kontrolle:

Standard (rek. Protein) Cyclin D1 (Santa Cruz Biotechnology,# sc-4074 WB) 1:100

Standard (rek. Protein) Cdk 2 (Santa Cruz Biotechnology,# sc-4069 WB) 1:100

Standard (rek. Protein) Cdk 4 (Santa Cruz Biotechnology,# sc-4070 WB) 1:100

Lösungen für den Western Blot:

NTE-Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH 7,4

0,12 g TRIS, 0,58 g NaCl ad 100 ml

NP40 10%tig (Sigma; # N 6507)

Glycerol 80%tig (Sigma; # G 9012)

Tris-Glycin Runningbuffer 10x (NOVEX; # LC 6675)

Transfer-Buffer (NOVEX; # LC 3675)

Tween 20 (Sigma; # P 5927)

TBST: 20 mM Tris·HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20

TBS: 20 mM Tris·HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

3% Bovine serum albumin BSA (Sigma # B 4287) in PBS (Gibco; # 14200-075)

## **2.7.2 Vorbereitung der Proteinproben**

Nach Auftauen der Proteinlösung auf Eis wurden in 0,5 ml Eppendorfröhrchen 10  $\mu$ l (30 –50 g) des Proteins mit 10  $\mu$ l Sample Buffer für 2 min in kochendem Wasser denaturiert und wieder auf Eis gelagert. Als Größenstandard wurden 5  $\mu$ l Marker mit 5  $\mu$ l Sample Buffer verwendet. Als Negativkontrolle diente Protein aus nicht infizierten CASMCs. Zur besseren Auflösung wurden je nach Proteingröße verschieden prozentige Tris-Glycin-Gele verwendet. Nach Zusammensetzen der Gel-Kammer und Laden der Proben wurde die Elektrophorese gepuffert mit 1x Running Buffer bei 125 V und 30–40 mA durchgeführt.

## **2.7.3 Blotten auf Nitrocellulose**

Nach Aufbrechen der Gelkassette und Entnahme des Gels wurde dieses für 10 min in 50 ml 1xTransfer Buffer inkubiert. Die Nitrozellulosemembran und vier Filterpapiere wurden auf die Größe der Blotkammer 8x6 cm zugeschnitten und wie folgt in der geöffneten Blotkammer geschichtet: Am Boden, dem Minuspol der Kammer, lagen zwei mit Transfer Buffer getränkte Pads, darauf ein Filterpapier, auf das das Gel gelegt wurde. Ein weiteres Filterpapier und zwei getränkte Blot pads bildeten den Abschluss. Nach Auflegen jeder neuen Schicht wurde mit dem hinteren Ende einer Pasteurpipette eingeschlossene Luft seitlich herausgestrichen. Die geschlossene



Blotkammer wurde dann in die Novexkammer eingesetzt, das Blotmodul mit 1xTransferbuffer und die Kammer mit ddH<sub>2</sub>O gefüllt. Geblottet wurde bei 30 V und 200 mA für 2 h.

Nach dem Blotten wurde die Membran 10 min getrocknet und konnte in einer Frischhaltefolie verpackt im Kühlschrank gelagert werden.

#### **2.7.4 Antikörpermarkierung der Membran**

Die Membran wurde kurz mit TBST gespült. Alle Inkubationsschritte wurden auf dem Schüttler durchgeführt. Um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren, wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation mit 3% BSA in PBS für 30 min gebunden. Der primäre Antikörper, der für das gesuchte Protein spezifisch war, wurde 30 min inkubiert. Die Antikörperverdünnung betrug 1: 200 in 50 ml TBST. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran in 50 ml TBST für jeweils 10 min entfernt. Der sekundäre Antikörper, der an das Fc-Fragment des primären Antikörpers bindet, wurde in einer Verdünnung von 1:3000 in 50 ml TBST angewendet. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran vorsichtig mit TBS gespült.

#### **2.7.5 Chemoluminiszenz**

Chemoluminiszenz entsteht durch Reaktion des Luminol mit der am Fc-Fragment des sekundären Antikörpers gebundenen alkalischen Phosphatase bzw. Peroxidase. Western Blotting Luminol Reagent wurde in Kombination mit Peroxidase gebundenen sekundären Antikörpern verwendet.

Lösung A (Luminol) und B (Peroxidase) wurden zu gleichen Teilen gemischt und etwa 5 ml auf die Membran geträufelt. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde die Flüssigkeit vom Rand der Membran her mit einem Filterpapier abgezogen, ohne dabei die Oberfläche der Membran zu berühren. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und exponiert ( X-OMAT von Kodak). Die Expositionszeit betrug je nach Stärke des Signals zwischen 10 sec und 2 min.

## 2.8 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von infizierten CASMC

Immunfluoreszenzfärbung wurde zur Verifikation der Proteinexpression des rekombinanten Adenoviruses durchgeführt.

In zweikammrige Zellkulturschalen wurden 30 000 CASMCs per Kammer ausplattiert und 24 h später mit einer MOI (multiplicity of infection) von 10 mit 1 ml Medium infiziert. Nach 16 h wurde das infektiöse Medium durch frisches Medium ersetzt. Nach 48 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert.

### 2.8.1 Material

Two Chamberslide ( Sarstedt)

Deckgläser ( Sigma)

Parafilm

Lösungen:

4% PFA in Buffer A:

1.6 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,4 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,5 g NaCl, 1 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>; mit ddH<sub>2</sub>O ad 900 ml; pH 7,4; mit H<sub>2</sub>O auf 1l bringen

-Primäre Antikörper:

Mouse anti-actin, smooth muscle monoclonal antibody (Chemicon International, # MAB 1522)

Mouse Anti-CMV protein IE72 monoclonal antibody ( Vancouver Biotech, # G13-6E1)

Mouse Anti-CMV protein IE84 monoclonal antibody ( Vancouver Biotech, # G13-12E2)

-Sekundäre Antikörper:

Texas Red dye-conjugated affinity purified Goat Anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, # 115 075 164)

Fluorescein (FITC)-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (Molecular Probes, # F-2761)

## **2.8.2 Zellfixierung mit 4% PFA**

Je Kammer wurden die Zellen zweimal mit 3 ml PBS gewaschen, mit 2 ml 4% PFA 10 min inkubiert und erneut zweimal mit 3 ml PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden bis zur Färbung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

## **2.8.3 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Nach zweimaligem Waschen mit 3 ml PBS auf dem Schüttler wurde die Zellwand mit 1,5 ml 0,1% Triton X für 10 min permeabilisiert. Das Triton X wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch 10 minütige Inkubation mit 3% BSA in PBS gebunden. Nachdem die Kammerwände vom Plättchen abgenommen worden waren, wurden tropfenweise 100 µl des 1:100 bis 1:50 mit BSA verdünnten primären Antikörpers zugegeben. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurde der Zellrasen mit Parafilmstreifen abgedeckt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde nach der Inkubationszeit durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:100 unter den gleichen Bedingungen. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde mit einem Papiertaschentuch Flüssigkeit vom Plättchen entfernt. Vor Aufbringen eines Deckgläschens wurde 1 Tropfen Fixieröl aufgetragen. Die Lagerung der gefärbten Objektträger erfolgte bei -4°C im Kühlschrank.

## **2.9 Messung der Zellproliferation mit Zellproliferations – ELISA**

### **2.9.1 Material**

96-Well Platten (Sarstedt)

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colormetric) (Boehringer Mannheim, # 1647 229)

hPDGF (R&D Dystems GmbH, # 120-HD-005)

Spektrometer

## 2.9.2 Zellproliferations-ELISA mit Bromodeoxyuridin

Prinzip:

Zellen werden mit Bromodeoxyuridin (BrdU), einem Pyrimidin-Analogon, inkubiert. Proliferierende Zellen bauen BrdU an Stelle von Thymidin in ihre DNA ein. Nach Fixierung der Zellen kann BrdU mit einem Anti BrdU Antikörper gebunden und mit Hilfe der Farbreaktion im Spektrometer quantifiziert werden. Die Absorption korreliert mit der Zahl der proliferierenden Zellen und der Menge der DNA-Synthese.

Zunächst wurden CASMCs in 96 Well-Platten zu 2 000 Zellen pro Well ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen mittels protrahiertem Serumentzug über 72 h in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus synchronisiert und arretiert. Dann erfolgte die Infektion mit rekombinantem Adenovirus in einer MOI von 10 sowie eine Stimulation durch Wachstumsfaktor PDGF-BBhaltiges (10 ng/ml) und 5% FCS haltiges Medium. BrdU-labeling Reagent ( 10 mM 5-bromo-2'-deoxyuridin in PBS, pH 7,4) war in einer Verdünnung von 1:1000 im Medium enthalten. Als Kontrolle dienten mit  $\beta$ -GAL-Adenovirus infizierte Zellen und nicht infizierte Zellen.

24 h nach Infektion wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l pro Well FixDenat fixiert. Zur Markierung mit Anti-BrdU-POD wurden 200  $\mu$ l pro Well Anti-BrdU-POD Working Solution (Monoklonaler Maus-Maus Antikörper, Klon BMG 6H8, Fab Fragmente, konjugiert mit Peroxidase) zugegeben und 90 min bei RT inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 200  $\mu$ l Waschlösung (1xPBS) entfernt. Zur Farbreaktion wurde 100  $\mu$ l Substrat ( Tetramethylbenzidin) verwendet. Nach 2-10 min wurde die Reaktion mit 25  $\mu$ l pro Well Stop Solution (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt und die Absorption im Elisameter bei 450 nm gemessen.

## 2.10 Messung der Zellproliferation mit <sup>3</sup>H Thymidinassay

Mit dem <sup>3</sup>H Thymidin assay erfolgte ein Nachweis der Zellproliferation der CASMC nach Infektion mit Ad-IE1 bzw. Ad-IE2 MOI 10.

Ein radioaktiv markierter DNA Vorläufer wird in einer Konzentration von 1  $\mu$ Ci auf die Zellen gegeben. Die Zellen nehmen diese Verbindung auf und überführen sie in das entsprechende Deoxynucleosid-Triphosphat. Nur replizierende Zellen bauen den markierten Vorläufer in die DNA ein. Das <sup>3</sup>H wird im  $\gamma$ -Scintillator nachgewiesen.

Es wurden 100 000 CASMCs pro 60 mm  $\varnothing$  Platte ausplattiert. Nach 24 h Inkubation in 5% FCS CASMC-Medium erfolgte eine Arretierung der Zellen durch schrittweise Serumreduzierung entsprechend dem Protokoll. Dafür wurden die Zellen zuerst 24 h in 1,5% FCS-haltigem CASMC-Medium, und daraufhin für 48 h in serumfreiem CASMC-Medium inkubiert.

Nach dieser Synchronisierung der Zellen wurden je mind. zwei Platten mit Ad-IE1, Ad-IE2, Ad- $\beta$ Gal und hCMV in einer MOI von 1, 10 oder bei hCMV 100 infiziert. Als Positivkontrolle wurde auf die entsprechenden Platten zeitgleich zur Infektion der übrigen Platten frisches 5% FCS Medium aufgetragen, analog dazu auf die Platten der Negativkontrolle serumfreies Medium.

Der Thymidinassay wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion, z.B. 24 h p.i. und 36 h p.i. mit je einer Platte mit Ad-IE1, Ad-IE2, Ad- $\beta$ Gal infizierten CASMCs, einer Positiv- und einer Negativkontrolle durchgeführt.

Zu diesen Zeiten erfolgte eine Zugabe von  $^3\text{H}$  Thymidin zum Medium in einem Verhältnis von 1:1000. Nach einer Thymidineinbauzeit von 6 h begann die Durchführung des Assay, analog wurde bei den späteren Zeitpunkten  $t= 36 \text{ h}, 48 \text{ h}, \text{etc.}$  verfahren.

### **2.10.1 Material**

$^3\text{H}$  Thymidin ( Amersham, # TRK120)

5%TCA ( Trichloracetylsäure) eiskalt ( Sigma,#76-03-9)

ETOH eiskalt

0,1M NaOH /2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Szintillationsflüssigkeit: Liquid scintillator QUICKSAFE A (ZINSSER ANALYTIC, #1008000)

### **2.10.2 Thymidinassay**

Die Zellen wurden 3 x vorsichtig mit 2 ml PBS-A gewaschen. Nach einer Inkubation von 20 min mit 5% TCA auf Eis wurde das TCA abgenommen und Duplikate aufbewahrt. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem ETOH gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml 0,1M NaOH/ 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung resuspendiert und

in 20 ml Szintillationsfläschchen umgefüllt. Kurz vor der Messung wurden 10 ml der Szintillationslösung zugegeben und die Proben gut gemischt.

## **2.11 Fugene Transfektion und Luciferaseassay**

Es wurden vier 12 Well-Platten mit 20 000 CASMCs pro Well vorbereitet. Bei einer Konfluenz von 60-80% wurde mit einer schrittweisen Serumreduktion begonnen. Nach einem 48 stündigem vollständigen Serumentzug erfolgte die Transfektion.

### **2.11.1 Transfektion**

Vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. 1 ml frisches serumfreies CASMC Medium wurde pro Well in 12 Well-Platten, 2 ml in 6 Well-Platten verwendet. Folgende Angaben beziehen sich auf 12 Well Platten, 6 Well Platten benötigen eine Verdoppelung der Menge an Fugene Reagenz, DNA und Medium:

Pro Well einer 12 Well Platte wurde 50 µl serumfreies Medium steril in ein 0,5 ml Eppendorftübchen pipettiert. Tröpfchenweise wurden 2 µl Fugene Reagenz pro Well hinzugefügt, ohne die Wand des Röhrchens zu berühren. Daraufhin wurden die Platten 5min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte bei Cotransfektion zweier DNAs das Ansetzen von jeweils 0,5 µg DNA pro Well in einem zweiten Eppendorftübchen, bzw. 1 µg DNA bei einfacher DNA-Transfektion. Anschließend wurde tröpfchenweise Fugene/Medium-Gemisch zur DNA hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden tröpfchenweise 50 µl aus dem Fugene/DNA/Medium-Gemisch pro Well der Zellkultur hinzugegeben. Die Platten wurden vorsichtig in „Achterschleifen“ geschwenkt und für 48-72 h im Brutschrank inkubiert.

### **2.11.2 Luciferaseassay**

Die Zellen wurden zweimal mit PBS ohne Magnesium und Kalzium gewaschen und 100 µl Cell Lysis Buffer bei 12 Well-Platten bzw. 300 µl bei 6 Well-Platten zugegeben. Mit einem Zellkratzer wurden die Zellen vorsichtig abgelöst und mit dem bereits aufgebrauchten Cell Lysis Buffer mehrfach resuspendiert. Die Proben wurden in 500 µl Eppendorftübchen übertragen und kurz bei 13 000 rpm zentrifugiert. Bis zur

Analyse wurden die Röhrchen auf Eis inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch einen Luminometer (berthold, AutoLumatPlus).

## **2.12 Messung der Zytotoxizität**

Durch Messung der LDH-Aktivität, die aus dem Zytosol von beschädigten Zellen in den Überstand abgegeben wird und die mit der Menge der lysierten Zellen korreliert, wird eine Quantifizierung von Zelltod und Zelllyse ermöglicht. Das Testprinzip beruht auf einer enzymatischen Umwandlung von Laktat durch LDH in Pyruvat. Das dabei entstehende NADH/H<sup>+</sup> wird in der Farbreaktion bei der Hydrierung von Tetrazolium (gelb) durch Catalyst ( Diaphorase) in Formazan (rot) wieder verbraucht. Die Absorption bei 490 nm korreliert mit der Anzahl der lysierten Zellen.

### **2.12.1 Material**

Cytotoxicity Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals; #16447939)

Assay-Medium: SmBM-Medium ( Clonetis;# CC-3181) mit 1% BSA (Sigma; # B 4287)

TritonX-100-Lösung: 2% Triton X ( Sigma) in Assay-Medium

Stop Lösung: 1N HCl

### **2.12.2 Assay**

CASMC Zellen wurden in Assay-Medium gewaschen. 100 µl der Zellsuspension bei einer Konzentration von 5000 Zellen/100 µl wurden pro Well einer sterilen 96 Well-Platte ausgesät. Die für die Hintergrund- und Substanzkontrolle bestimmten Wells wurden mit Assay-Medium ohne Zellen gefüllt. Die Zellen wurden über Nacht in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um die Zellen adhären zu lassen. Das Assay-Medium wurde durch 100 µl frisches Assay-Medium ersetzt, um über Nacht entstandene LDH-Aktivität zu beseitigen. In einer MOI von 100 wurden die Zellen mit 100 µl Ad-IE1, Ad-IE2 infiziert. Als Kontrolle dienten mit Ad-βGal infizierte Zellen sowie PDGF stimulierte Zellen. Die Positivkontrolle bildeten mit Cocksackievirus infizierte Zellen. Die Wells für die Hintergrundkontrolle wurden mit

200 µl Assay-Medium gefüllt, die Wells für die Sustanzkontrolle wurden mit 100 µl Assay-Medium und 100 µl des virushaltigen Mediums hinzugefügt. Die 96 Well-Platte wurde 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. 100 µl des Überstandes wurden vorsichtig in eine frische 96 Well Platte mit flachem Boden umpipetiert und in jedes Well wurden erneut 200 µl Assay-Medium gegeben. Für die LDH Aktivitätsbestimmung im Überstand wurden 100 µl der Reaktionsmischung in jedes Well zugegeben und lichtgeschützt für 30 min bei 15-20°C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 490 nm, die Referenzwellenlänge betrug 630 nm.

## **2.13 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung der Ploidität von Zellen. Die Zellen werden mit einem Farbstoff behandelt, der fluoresziert, wenn er an die DNA bindet. Die Intensität der Fluoreszenz ist dann der DNA Menge in jeder einzelnen Zelle direkt proportional. Zellen mit einfachem DNA-Gehalt befinden sich in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase, Zellen mit diploidem DNA-Gehalt in der G<sub>2</sub>-/M-Phase, Zellen, deren DNA Gehalt zwischen diesen Werten liegen, befinden sich in der S-Phase.

### **2.13.1 Material**

CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit (Becton Dickinson; # 340242): Trypsin-Puffer, Trypsin-Inhibitor- und RNase-Puffer-Lösung, Propidium Iodid-Färbelösung

Aluminiumfolie

35 oder 50 µM Nylonsieb (Falcon)

FACS-Glasröhrchen (Becton Dickinson)

FACS-Cytometer (Becton Dickinson)



### **2.13.2 Zellvorbereitung**

Es wurden 32 75 mm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit CASMCs belegt. Bei einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen nach Protokoll schrittweise synchronisiert und 48 h lang bei FCS freiem Medium arretiert. Es wurden je 6 Flaschen mit Ad-IE1, Ad-IE2 und VP-1 in einer MOI von 10 infiziert. 6 Flaschen wurden nicht stimuliert als Negativkontrolle aufbewahrt und als Positivkontrolle wurden 6 Flaschen, mit PDGF in serumhaltigen SBmB Medium stimuliert.

Zu 6 verschiedenen Zeitpunkten: t=6 h, t=12 h, t=24 h, t=36 h, t=48 h, t=72 h wurden die Zellen der jeweiligen Flaschen mit Trypsin abgelöst und zweimal in PBS ohne Magnesium gewaschen.

### **2.13.3 Zellfärbung mit Propidium Iodid**

Die Färbung der DNA erfolgte mit dem CycleTest<sup>TM</sup> Plus DNA Reagent Kit. Die abgelösten Zellen wurden in einer Konzentration von ca.  $5 \times 10^5$  Zellen bei 400xg 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Auf das Pellet wurden 250 µl der Trypsin-Puffer Lösung gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min wurden 200 µl der Trypsin-Inhibitor- und Rnase-Puffer-Lösung hinzugegeben und wiederum vorsichtig gemischt. Diese Suspension wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann wurden 200 µl der eiskalten Propidium Iodid-Färbelösung vorsichtig hinzugemischt. Hierauf folgte lichtgeschützt eine Inkubation bei 2-8°C für 10 min. Mit einem 35 oder 50 µM Nylonsieb von Falcon wurden die Proben filtriert. Innerhalb der nächsten 3 h nach Zugabe des Propidiumiodids musste die Messung der Proben erfolgen. Bis dahin war eine Aufbewahrung der Proben lichtgeschützt bei 2-8°C möglich.

### **2.13.4 Durchflusszytometrie**

Die Proben wurden im Durchflusszytometer (Becton Dickinson) mit einem Argonlaser bei 488nm (Kanal 2) gemessen.

Die Softwareanalyse der Daten erfolgte mittels ModFit<sup>R</sup> 2.0 (Verity Software House, US).

## 2.14 Cyclin A Kinase assay

Der Cyclin A Kinase Assay ermöglicht eine Zellzyklusanalyse durch Messung der Phosphorylierung von Histon H1 durch Cyclin A/CDK1 Komplexe der G1-Phase. Mittels Immunpräzipitation wird der zu untersuchende Cyclin/CDK Komplex isoliert. Um die Aktivität des Cyclin A/CDK1 Komplexes messen zu können, muss eine Phosphorylierung von Histon H1 durch andere Proteinkinasen durch Zugabe eines Proteinkinaseninhibitors verhindert werden. Die Phosphorylierung von Histon H1 mit radioaktiv markiertem Phosphat wird durch Auftrennung in einem SDS Polyacrylamidgel und Autoradiographie detektiert.

### 2.14.1 Material

Zellen in 6cm Kulturplatten (Sarstedt)

1x eiskaltes PBS (Gibco)

eiskalter Lysis Buffer

Protein A-Sepharose Conjugate (Amersham Pharmacia Biotech)

Anti-Cyclin Antikörper

Anti-CDK Antikörper

eiskalter Kinase Buffer

Histon-H1 Lösung

1 mM ATP in ddH<sub>2</sub>O

2000 Ci/mmol ( $\gamma$ -<sup>33</sup>P) ATP

100 mM EDTA

2X SDS sample Buffer

PKA Inhibitionspeptid: 1 mM Peptid (Sigma) in 10 mM Natriumphosphat, pH 7,2

50 mM Roscovitine (Calbiochem) in DMSO

Negativkontrolle: Immunpräzipitierte Anti-IgG Antikörper

Positivkontrolle: Cyclin A/CDK1

75 mM Phosphorsäure (7,5 ml 1 M Phosphorsäure + 92,5 ml ddH<sub>2</sub>O)

96% Ethanol

15%-20% SDS Polyacrylamidgel

Coomassie Blau G-250 Färbelösung

Entfärbungslösung: 10% Essigsäure

Filterpapier

Plastikfolie

### **2.14.2 Immunpräzipitation**

Mit Zellen belegte Kulturplatten á 6 cm<sup>2</sup> wurden auf einer Glasplatte auf Eis gestellt. Das Medium wurde mit einer Pasteurpipette entfernt, 3 ml eiskaltes PBS aufgetragen und für 1 min auf Eis inkubiert. Das PBS wurde wieder entfernt, durch neues ersetzt und nach einer weiteren Minute sorgfältig entfernt. 1 ml Lysis Buffer wurde auf die Zellen gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Mit einem Zellkratzer wurden die Zellen vom Boden abgelöst und mit einer gekühlten 1 ml Spritze mit aufgesetzter 21G Nadel in kleine vorgekühlte 1,5 ml Tübchen transferiert. Um die DNA zu denaturieren, wurde das Lysat dreimal mit der Spritze auf- und abgezogen. Hierauf wurden 10 µl Protein A Sepharose zugegeben und das Lysat für 20 min mit 10 000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Lysat wurde mit einer vorgekühlten 1 ml Pipettenspitze vorsichtig entfernt, um nicht das Pellet aufzulösen. Anti-Cyclin A Antikörper wurde in einem vorgekühlten Tübchen dazugegeben ( 1:1000) und auf Eis gelagert. Bei 4°C wurden die Proben zwischen 1 h und 12 h in einem Schüttler gemischt und dann 5 min mit 1000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Lysat wurde in ein frisches vorgekühltes 1,5 ml Tübchen gegeben, das 30-50 µl einer 50% Protein A Sepharose in eiskaltem Lysepuffer enthielt. Die Proben wurden 30-45 min in dem Schüttler bei 4°C durchmischt und bei maximaler Geschwindigkeit 5 sec bei 4°C zentrifugiert. Das Lysat wurde mit einer 1 ml Pipettenspitze entfernt. Dem Pellet wurden 700 µl eiskalten Lysepuffer zugegeben und die Proben mit 10 000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die Mikrozentrifugation wurde dreimal mit jeweils 700 µl Lysis Buffer wiederholt.

### **2.14.3 Kinasereaktion**

Der Überstand wurde entfernt und 1 ml eiskalter Kinasepuffer dem Pellet hinzugefügt. Die Proben wurden 5 min mit 10 000 x g bei 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurde das Kinaseassay-Gemisch vorbereitet:

80 µl Kinasepuffer, 4 µl 1mM ATP (40 µM final), 4 µl 10µCi/µl ( $\gamma$ -<sup>33</sup>P) ATP 82000 Ci/mmol), 0,5 µl 10 mg/ml Histon H1 (50 µg/ml final), 2 µl 1mM PKA Inhibitionspeptid (20 µM final) und 9,5 µl ddH<sub>2</sub>O.

20 µl des Kinasegemisches wurde dem Pellet zugegeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Der Positiv- und der Negativkontrolle wurden ebenfalls 20 µl zugegeben.

#### **2.14.4 SDS-Gelelektrophorese**

Um die Kinasereaktion zu stoppen, wurde den Proben 10 µl des 2 x SDS-PAGE Sample Buffer zugefügt. Die Proben wurden 3 min gekocht und in einem 15%igen SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mit 500 ml Färbelösung wurde das Gel 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbelösung wurde abgeschüttet und das Gel mit 500 ml Entfärbungslösung 20 min entfärbt. Die Entfärbung wurde dreimal mit 250 ml Entfärbungslösung wiederholt. Das Gel wurde auf ein Filterpapier gelegt, mit Plastikfolie eingewickelt und in einem Geltrockner für 1 h bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde das Gel mit einem Röntgenfilm exponiert, dabei führt phosphoryliertes radioaktives Histon H1 zu einer Schwärzung des Röntgenfilms in Form einer doppelten Bande bei 30 kD.

## 3 Ergebnisse

### 3.1.1 Kinetik zur Zellarrettierung und Synchronisation CASMCs mittels FCS Entzug

Um bei den geplanten Proliferationsversuchen gleiche Ausgangsbedingungen zu erzielen, mussten sich alle verwendeten Zellen in der gleichen Zellzyklusphase befinden. Um die Stimulierbarkeit im Wachstum zu beurteilen, sollten sich alle Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase, der Ruhephase befinden.

Um CASMCs für Proliferationsversuche zu synchronisieren und im Wachstum zu arretieren, wurden Wachstumsfaktoren mittels FCS Entzug depletiert. Anschließend wurde der Effekt eines schrittweisen Entzugs des FCS Anteils im Medium auf die Zellen untersucht und besonders ihr Wachstumsverhalten und der Phänotyp der Zellen beobachtet, der sich möglichst nicht verändern sollte.

Die Kinetik zeigte, dass eine schrittweise Reduzierung des FCS Anteils den CASMCs nicht schadete, den Phänotyp der CASMCs nicht veränderte und die Zelle schonend in die G<sub>0</sub>-Phase überführt. Die besten Ergebnisse wurden erzielt durch eine 12-stündige Inkubation der Zellen mit einem Mediumgemisch im Verhältnis von 30% serumhaltigem Medium und 70% serumfreiem Medium. Anschließend erfolgte ein Serumwechsel und die Zugabe von 100% serumfreiem Medium. Nach einer Inkubation von 48 h mit serumfreiem Medium befanden sich nahezu alle Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase. Es konnte semiquantitativ durch Mikroskopie kein gesteigerter Zelltod festgestellt werden.

Aus der erzielten G<sub>0</sub>-Phase ließen sich die Zellen durch Gabe von Wachstumsfaktoren stimulieren oder durch Serumentzug konstant arretieren.

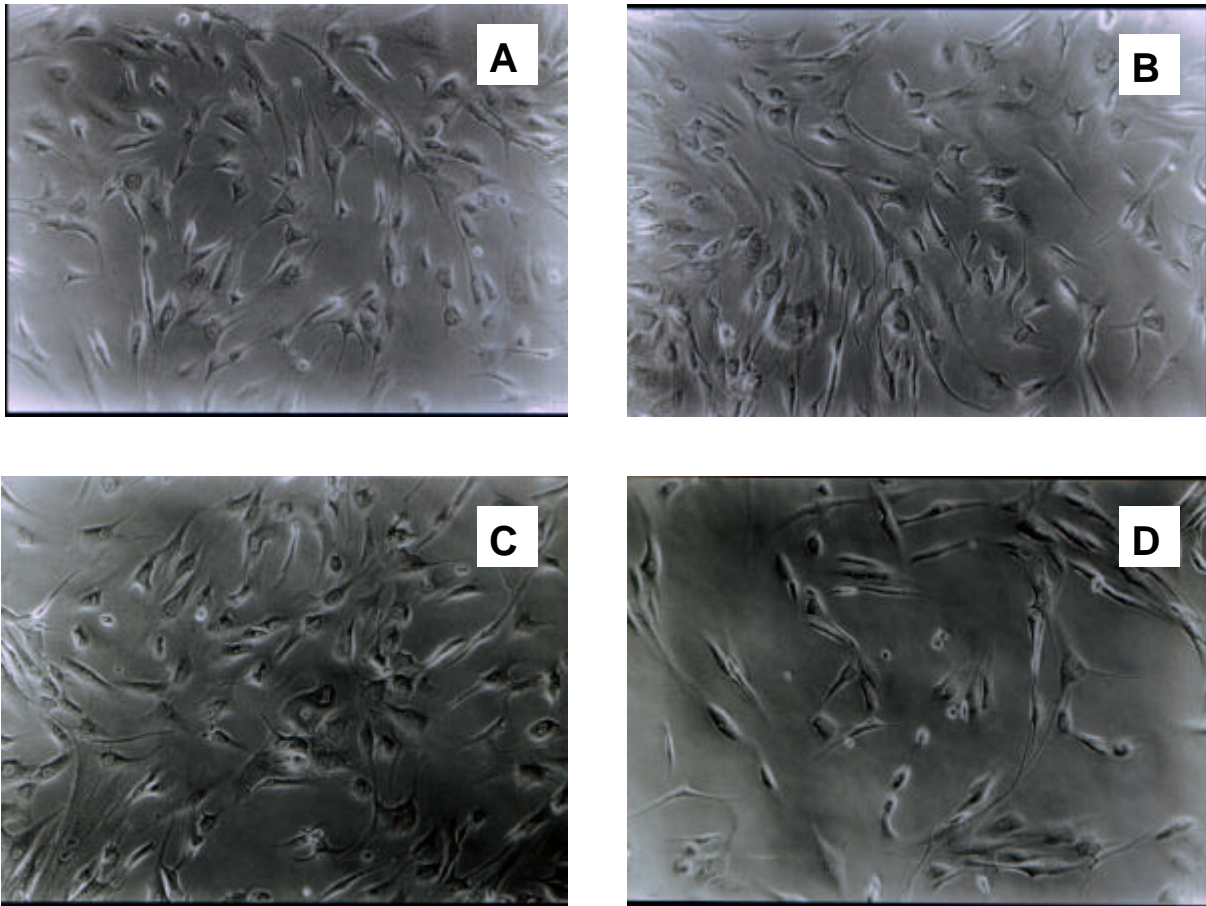


Abb. 4: Serumentzugskinetik mit CASMCs; A zeigt CASMCs vor Serumreduktion, B zeigt proliferierte CASMCs nach 24 h in 1,5% FCS, Bild C zeigt arretrierte CASMCs 48 h nach 2. Serumreduktion (0% FCS) mit Veränderung der Zellform, D zeigt CASMCs mit cytopathischem Effekt 72 h nach Inkubation mit 0%igem Medium mit Abrundung, Auflösung der Zelladhäsion und Schwimmen im Medium.

## Schrittweiser Serumentzug

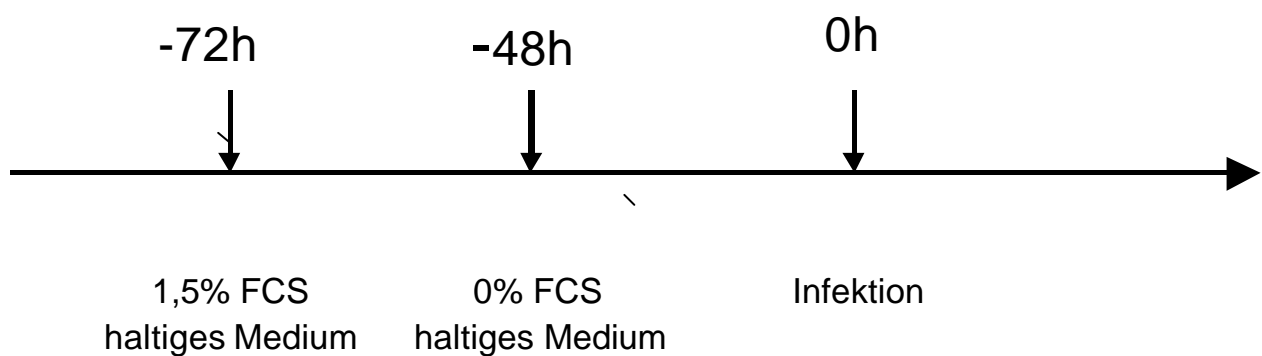


Abb.5: zeitliche Übersicht über Zellsynchronisierung und Wachstumsarretierung durch FCS-Entzug vor Infektion

### 3.1.2 Nachweis der Infizierbarkeit der CASMCs mit hCMV durch indirekte Immunfluoreszenz

Cytomegalieviren bevorzugen innerhalb eines Wirtsorganismus bestimmte Zellarten. Es gibt nur eine limitierte Anzahl an CMV permissiven Zellen, wie z.B. Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen <sup>43</sup>. Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass CASMCs für eine Infektion mit hCMV permissiv waren.

Die mit hCMV in unterschiedlichen MOIs infizierten CASMCs wurden mit hCMV Ak 1:50 markiert und mit Anti-hCMV-AK 1:200 angefärbt und zeigten im Fluoreszenzmikroskop entsprechend des Replikationsortes des hCMV die Fluoreszenzen im Zellkern der CASMCs ( Abb. 6).

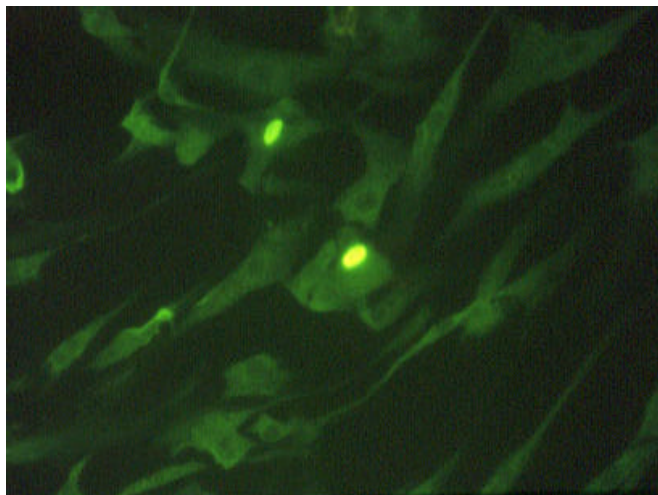


Abb. 6: indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen hCMV mit hCMV Ak markiert, 24 h nach Infektion von CASMCs mit einer MOI von 1

### 3.1.3 Nachweis der Zellproliferation nach Infektion von CASMCs mit hCMV in MOI von 0,1 bis 10

#### 3.1.3.1 Zellproliferations-ELISA mit Bromodeoxyuridin

CASMCs wurden nach Protokoll schrittweise synchronisiert. Es erfolgte eine Infektion der CASMC mit hCMV in einer MOI von 0.1, 1 und 10. Infektion mit lac Z sowie nicht

infizierte serumarretierte Zellen dienten als Negativkontrolle, Positivkontrolle waren durch 5% FCS haltiges Medium stimulierte Zellen.

BrdU-labeling reagent (10 mM 5-bromo-2'-deoxyuridin in PBS, pH 7,4) war im Medium enthalten. 24 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert. Nach Fixierung der Zellen wurde BrdU mit einem Anti-BrdU Antikörper gebunden und mit Hilfe der Farbreaktion im Spektrometer quantifiziert. Die Absorption korreliert mit der Zahl der proliferierenden Zellen und der Menge DNA-Synthese.

Es konnte eine gesteigerte Proliferation von hCMV infizierten CASMCs im Vergleich zu nicht infizierten und lac Z infizierten Zellen festgestellt werden. Die mit einer MOI von 10 infizierten Zellen zeigten eine geringere Proliferation, was vermutlich aufgrund des in dieser Konzentration auftretenden zytopathischen Effektes resultiert.

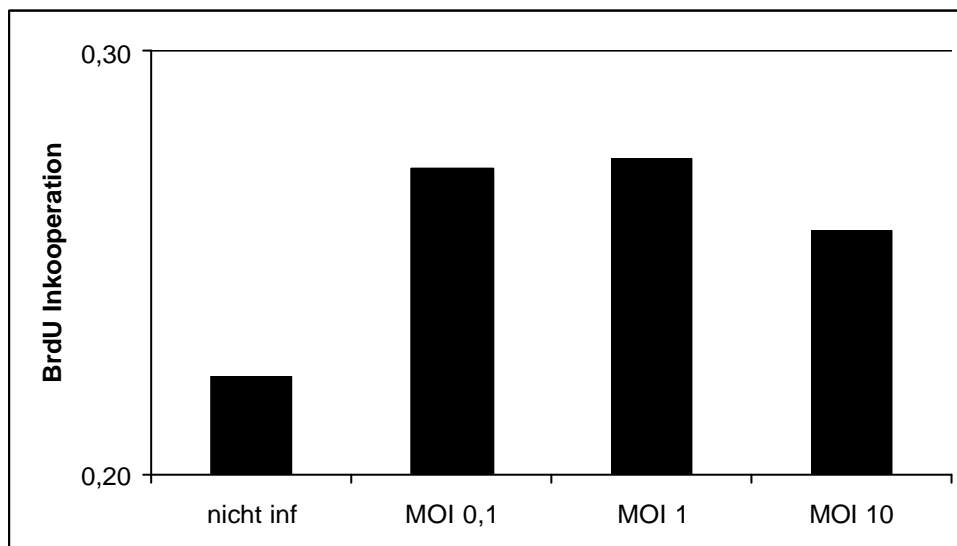


Abb. 7: BrdU Inkorporation der CASMCs nach Infektion mit hCMV  
MOI 0.1, MOI 1 und MOI 10



## 3.2 Charakterisierung der adenoviralen IE1/IE2-Überexpression in CASCs

### 3.2.1 Subklonierung des IE1/IE2 in pBluescript

Nach einem Restriktionsverdau des 6,7 kb großen pCMV IE1 (PHM 135, Stamminger) mit Eco RI und Apa I bzw. des 7,2 kb großen pCMV IE2 (PHM 134, Stamminger) wurde das 1,5 kb große IE1 Fragment bzw. das 2 kb große IE2 Fragment aus Agarose extrahiert und mit Ligase je in einen Vektor pBluescript<sup>R</sup> II SK(+/-) (2,96 kb) von Stratagene einkloniert. Abbildung 8 zeigt den Kontrollverdau der klonierten pBlue IE1 und pBlue IE2 mit den aufgetrennten DNA Fragmenten von 1,5 kb ( IE1) und 2,96 kb (pBluescript<sup>R</sup> II SK(-)) sowie 2 kb ( IE2) und 2,96 kb (pBluescript<sup>R</sup> II SK(-)).

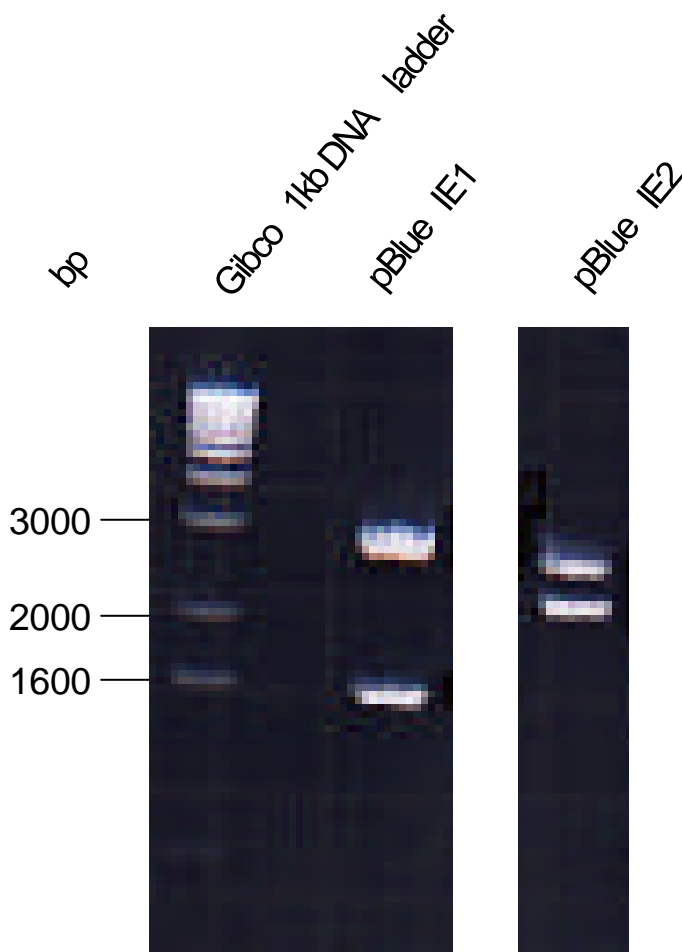


Abb. 8: Kontrollverdau von pBlue IE1 und pBlue IE2 mit Eco RI und Apa I: auf Bahn 1 ist ein 1kb Marker aufgetragen, Bahn 2 und 3 zeigen die DNA Fragmente des klonierten IE1 (1,5 kb) und IE2 (2 kb), sowie des Vektors pBluescript<sup>R</sup> II SK(-) (2,96 kb)

### 3.2.2 Klonierung in den pAcCMV SR(-) Shuttlevektor

Mit Xba I und Kpn I erfolgte der Restriktionsverdau des vorher klonierten pBlue IE1 (4,4 kb) bzw. pBlue IE2 (4,9 kb). Die erhaltenen 1,5 kb und 2,0 kb großen Fragmente IE1 und IE2 wurden nach Extraktion aus Agarose mit dem durch Xba I und Kpn I geschnittenen Shuttlevektor pAcCMV SR(-) (8,8 kb) ligiert. Abbildung 9 und 10 zeigen den Kontrollverdau der klonierten pCMV IE1 und pCMV IE2 mit den aufgetrennten DNA Fragmenten von 1,5 kb ( IE1) und 8,8 kb (pAcCMV SR(-)) sowie 2 kb ( IE2) und 8,8 kb (pAcCMV SR(-)).

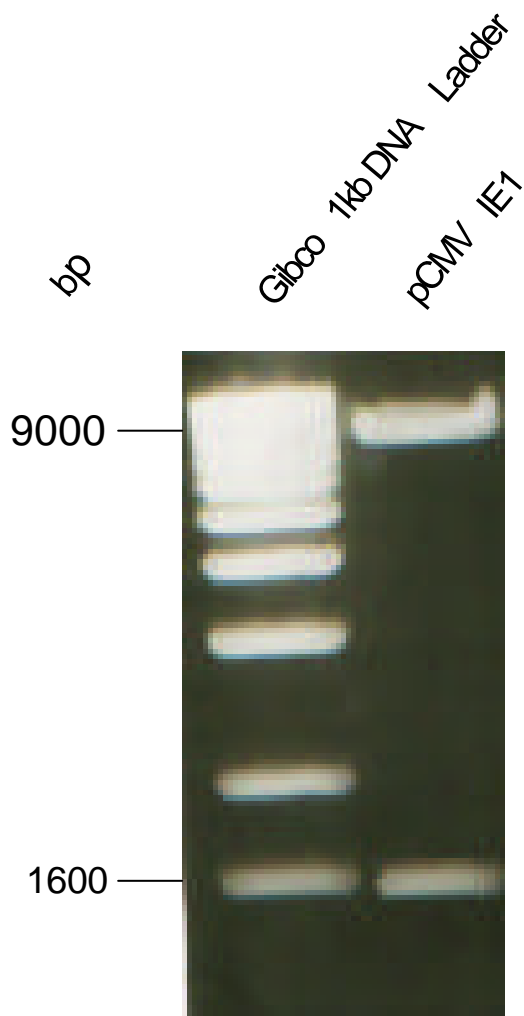


Abb. 9: Kontrollverdau von pCMV IE1 mit Xba I und Kpn I: auf Bahn 1 ist ein DNA Marker aufgetragen, Bahn 2 zeigt die 1,5 und 8,8 kb große DNA Fragmente des klonierten pCMV IE1.

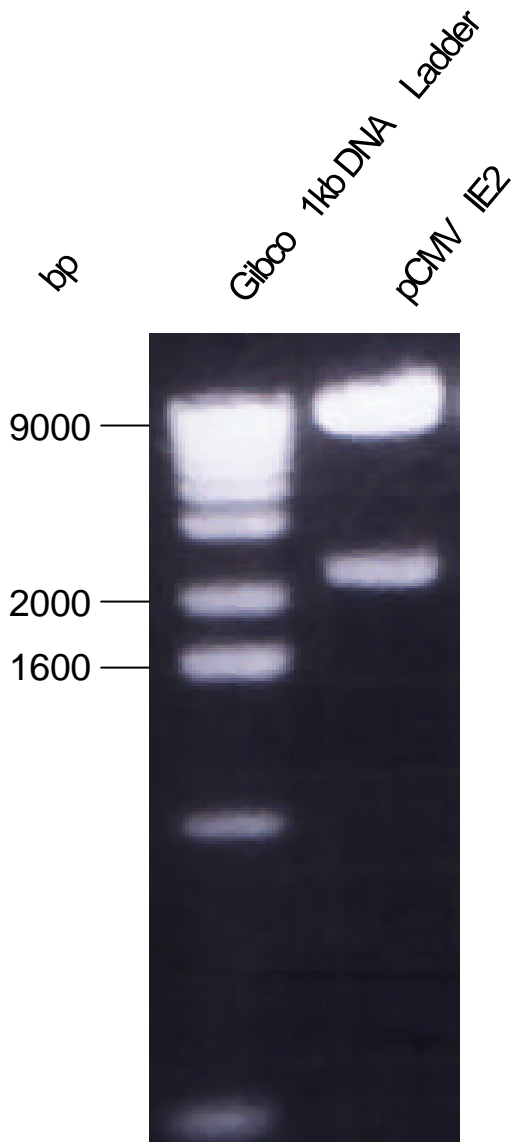


Abb. 10: Kontrollverdau von pCMV IE2 mit Xba I und Kpn I: auf Bahn 1 ist ein DNA Marker aufgetragen, Bahn 2 zeigt die 2 kb und 8,8 kb große DNA Fragmente des klonierten pCMV IE2.

### 3.3 Klonierung eines mit IE1 bzw. IE2 rekombinanten replikationsdefizienten adenoviralen Vektors

Ein rekombinanter replikationsdefizienter adenoviraler Vektor kann CASMCs besser infizieren als hCMV, es ermöglicht eine hohe Proteinexpression des Fremdgens, ist leicht manipulierbar und hoch titrierbar.

Nach erfolgreicher Cotransfection des Shuttlevektors pCMV IE1 bzw pCMV IE2 mit dem adenoviralen DNA Vektor PJM 17 entstehen ab dem 9. Tag Plaques, die als Löcher im Zellrasen durch Hinzufügen von 1% Neutral Red zum Agar sichtbar gemacht werden oder im Gegenlicht als runde Aufhellungen im Zellrasen erscheinen.

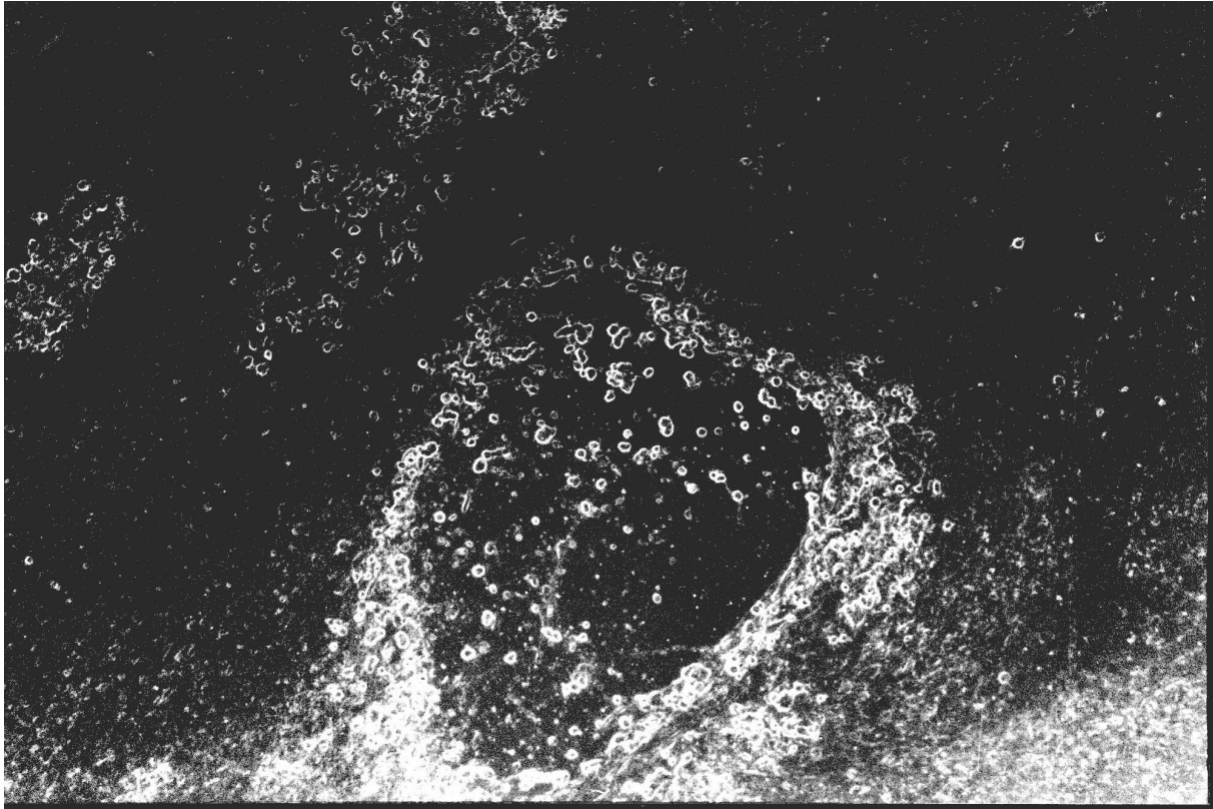


Abb. 11 : Adenovirus-Plaques in 293 Zellen 10 Tage post transfectionem

### 3.3.1 Virusnachweis und erste Viruspropagierung

Zur Feststellung des Virusgehalts eines Plaques wurden 293 Zellen mit virushaltigem Medium versehen. Die Infektion von Zellen konnte nach ein bis drei Tagen am zytopathischen Effekt erkannt werden. Infizierte Zellen werden ödematös, bilden Vakuolen im Zytoplasma, runden sich ab und lösen sich vom Plattenboden.

Wenn der zytopathische Effekt etwa 50% der Zellen eines Lochs erfasst hatte, wurden die Zellen mit einem Zellabkratzer vom Plattenboden abgelöst und die Medium-Zellsuspension bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Erst nach dreimaligem Auftauen und Abfrieren wurde das virushaltige Medium zur weiteren Infektion verwendet.

### 3.3.2 Viruspropagierung und Herstellung eines Large Scale Prep

Infiziert wurden zu 80% konfluente 293 Zellen. Nach Entfernen des Mediums wurden 100 µl des zuvor erhaltenen Virus-Medium-Gemisches und 900 µl frisches Medium zugegeben. Durch Schwenken der Flaschen wurde die Flüssigkeit gleichmäßig über dem Zellrasen verteilt. Um eine große Infektionsrate zu erzielen, wurden zur Infektion möglichst kleine Volumina verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C 1 h inkubiert und dabei alle 10 min geschwenkt. Nach einer Stunde wurden 8ml 293 Medium hinzugegeben. Der zytopathische Effekt stellte sich nach 12-36 h ein.

Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen und mit einem β-Galaktosidase rekombinanten Adenovirus infizierte Zellen. Nachdem bei 50% der Zellen ein zytopathischer Effekt aufgetreten war, wurden die Zellkulturflaschen bei -70°C eingefroren. Nach dreimaligem Auftauen und Abfrieren wurden die Zellen mit einem Zellkratzer vom Flaschenboden abgelöst und die Zell-Medium-Suspension bei -70°C gelagert.

### 3.4 Propagierung der Plaques und Durchführung eines Plaque forming assay in 293 Zellen zur Bestimmung der Titer

Zur Titerbestimmung wurden 293 Zellen mit verschiedenen Viruskonzentrationen von 1:10 bis  $10^{-8}$  infiziert und mit 2xDMEM Agarose-Medium Overlay bedeckt. Sieben Tage nach dem Aufbringen des Agar-Medium-Overlays konnten die Plaques ausgezählt werden. An Hand der Anzahl der auftretenden Plaques, der verwendeten Virusverdünnung und des zur Infektion eingesetzten Volumens konnte der Virustiter nach folgender Formel errechnet werden:

$C[\text{PFU/ml}] = \text{Plaqueanzahl} \times 1000 / \text{eingesetzte Virusmenge in } \mu\text{l} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ . Der Virustiter wurde in der Einheit PFU (plaqueforming units)/ ml angegeben.

Der Titer des IE1 rekombinanten replikationsdefizienten Adenovirus Ad-IE1 betrug  $1 \times 10^8$ , der Titer des IE2 rekombinanten replikationsdefizienten Adenovirus Ad-IE2 betrug  $6,7 \times 10^8$  und Ad-βGal hatte einen Titer von  $1,7 \times 10^8$ .

### **3.5 Verifikation der rekombinanten Proteinexpression von IE1 und IE2 in CASMC nach Infektion mit IE1 bzw IE2 rekombinanten Adenovirus**

#### **3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Die Verifikation der Proteinexpression der mit dem rekombinanten replikationsdefizienten Adenovirus infizierten CASMCs erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung.

CASMCs wurden mit einer MOI (multiplicity of infection) von 10 infiziert. Nach 16 h wurde das infektiöse Medium durch frisches Medium ersetzt. Nach 48 h wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und die Zellwand mit 0,1% Triton X permeabilisiert. Das Triton X wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt. Zur Antikörpermarkierung wurde der 1:100 bis 1:50 mit BSA verdünnte primäre Antikörper Mouse Anti-CMV protein IE84 (IE2) bzw. IE72 (IE1) monoclonal Antibody (Vancouver Biotech) und der sekundäre Antikörper Fluorescein (FITC)-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (Molecular Probes) in einer Konzentration von 1:100 verwendet.

Die indirekte Immunfluoreszenz nach Infektion der CASMC mit dem rekombinanten Ad-IE1 und Ad-IE2 mit MOI 10 ergab eine hohe Proteinexpression im Zellkern der CASMCs ( Abb. 12). In nicht infizierten Zellen konnte keine Expression der Proteine festgestellt werden.

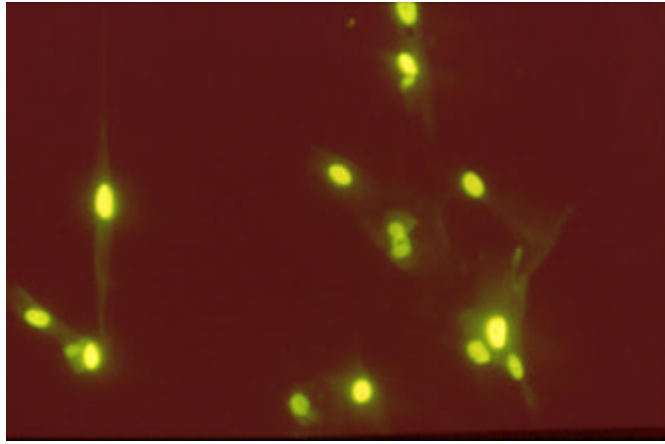


Abb.12: Immunfluoreszenz gegen IE2 von Ad-IE2 infizierten CASMCs in einer MOI von 10 nach rekombinanten Gentransfer im Fluoreszenzmikroskop.

### **3.5.2 Westernblot mit hCMV und Ad-IE1 bzw Ad-IE2 zum Nachweis rekombinanter Genexpression Ad-IE1 bzw. Ad-IE2**

Es wurde eine Proteinkonzentration von 40 µg eingesetzt, der 1. Antikörper gegen IE1 bzw. IE2 (Vancouver) wurde in einer Konzentration von 1:2500 aufgetragen, der 2. Antikörper Sheep anti-Mouse ( Amersham) in einem Verhältnis von 1:5 000. Als Negativkontrolle wurden HFF Zellen verwendet. Die Expositionszeit zwischen der mit Chemoluminiszenzlösung versehenen Membran und dem Film (Kodak Xomat) betrug 1 min.

Entsprechend der Größe des IE1 konnte bei 72 kD und entsprechend der Größe des IE2 bei 84 kD ein Protein detektiert werden. Bei uninfizierten Zellen war in diesen Bereichen keine Proteinbande nachweisbar.

### **3.6 Proteinisolierung zu verschiedenen Zeiten post infectionem**

Es wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion der CASMCs mit Ad- IE1 und Ad-IE2 Proteine isoliert, um zu untersuchen, welche für den Zellzyklus entscheidenden Proteine durch eine Überexpression mit Ad-IE1 bzw. Ad-IE2 exprimiert werden und in welchem zeitlichen Zusammenhang zur Infektion diese Expression erfolgt. Als Positivkontrolle dienten PDGF stimulierte CASMCs, als Negativkontrolle serumfrei inkubierte CASMCs.

Die Proteinisolierung erfolgte 24 h, 48 h und 72 h post infectionem.

### 3.7 Bestimmung der Proteinkonzentrationen durch den Bradford assay (Biorad):

Durch einen Bradford assay (Biorad) wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt.

Proteinkonzentrationen Western Blot

	Konstrukt	Konzentration	30 $\mu$ g=x $\mu$ l	3 $\mu$ g =x $\mu$ l	6xLoader	3 $\mu$ g =x $\mu$ l
<b>t=24h</b>	Kontrolle	0,238	126	12,6	2,5	15,1
	IE-1	0,243	123	12,3	2,5	14,8
	IE-2	0,256	117	11,7	2,3	14,1
	$\beta$ Gal	0,334	90	9,0	1,8	10,8
	PDGF 10ng	0,296	101	10,1	2,0	12,2
<b>t=48h</b>	IE-1	0,35	86	8,6	1,7	10,3
	IE-2	0,287	105	10,5	2,1	12,5
	$\beta$ Gal	0,454	66	6,6	1,3	7,9
	PDGF 10ng	0,638	47	4,7	0,9	5,6
	<b>t=72h</b>	IE-1	0,33	91	9,1	1,8
IE-2		0,266	113	11,3	2,3	13,5
$\beta$ Gal		0,383	78	7,8	1,6	9,4
PDGF 10ng		0,663	45	4,5	0,9	5,4

Abb. 13: Proteinkonzentrationen für Western blot

Zur Bestätigung der Auftragung annähernd identischer Proteinmengen innerhalb eines Western Blot wurde ein Kontrollgel angefertigt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie brilliant blue (0,25g Coomassie brilliant blue R250 in 90ml 1:1 Methanol/H<sub>2</sub>O und 10ml eiskalter Essigsäure, gefiltert in Whatman No. 1 Filter) für 4,5 h. Die Entfärbung dauerte 36 h (90 ml 1:1 Methanol/H<sub>2</sub>O und 10 ml eiskalter Essigsäure, gefiltert in Whatman No. 1 Filter).

Die Färbung der Gele, auf denen die Proteine gleichmäßig in den im Bradford Assay ermittelten Proteinkonzentrationen aufgetragen worden sind, zeigte, dass die mittels des Bradfordassay ermittelten Proteinkonzentrationen so exakt sind, dass eine Aussage über die Expression unterschiedlicher Zellzyklusproteine wie Cycline und Cdks durch den direkten optischen Vergleich der Bandenstärke zulässig ist. Dadurch wird eine Untersuchung von verschiedenen selbst gewonnenen Proteinen ermöglicht.



## 3.8 Proliferationsnachweis durch Thymidin assay und Durchflusszytometrie

### 3.8.1 <sup>3</sup>H Thymidin assay

DNA Neusynthese in der S-Phase wurde durch Inkorporation von <sup>3</sup>H Thymidin gemessen. Das markierte Nukleotid wurde 6 h vor dem Ernten der Zellen aufgebracht. Nach Zelllyse erfolgte die Messung in einem Szintillationszähler.

Im Vergleich zu unstimulierten Zellen konnte man eine deutlich höhere Nukleotid-Inkorporation in IE2 transduzierten Zellen feststellen. Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

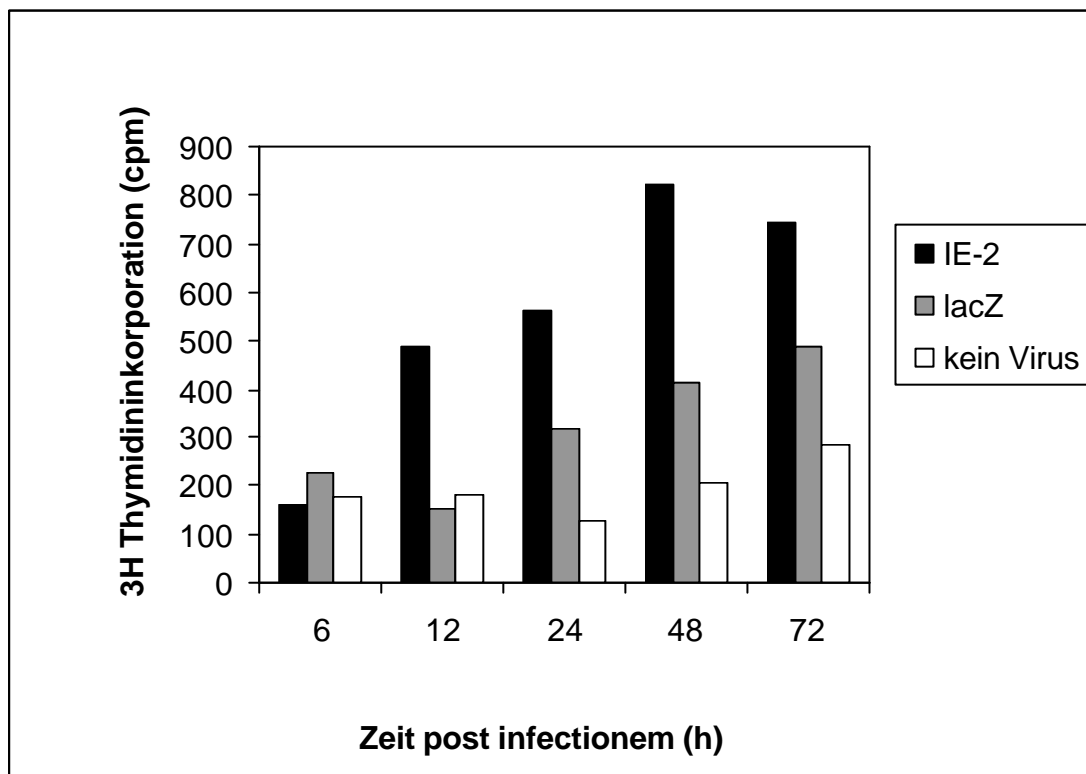


Abb. 14: <sup>3</sup>H Thymidininkorporation in IE2 transformierten CASMCs im Vergleich zu lacZ infizierten CASMCs sowie nicht infizierten CASMCs

### 3.8.2 Durchflusszytometrie mit Propidium Iodid (PI) zur Bestimmung der Zellzyklusprogression

Es wurden CASMCs bei einer Konfluenz von 70% nach Protokoll schrittweise synchronisiert und 48 h lang bei FCS freiem Medium arretiert. Anschließend wurden sie mit Ad-IE2 und VP1 in einer MOI von 10 infiziert. Als Negativkontrolle wurden

nicht stimulierte CASMCs, als Positivkontrolle wurden mit PDGF in serumhaltigen SBmB Medium stimulierte CASMCs verwendet.

Zu 6 verschiedenen Zeitpunkten: t=6 h, t=12 h, t=24 h, t=36 h, t=48 h, t=72 h wurden CASMCs der jeweiligen Versuchsansätze mit Trypsin abgelöst und zweimal in PBS ohne Magnesium gewaschen.

Die Färbung der DNA erfolgte mit dem CycleTest™ Plus DNA Reagent Kit. Innerhalb der nächsten 3 h nach Zugabe des Propidiumiodids erfolgte die Messung der Proben. Die Proben wurden im Durchflusszytometer (Becton and Dickinson) mit einem Argonlaser bei 488 nm (Kanal 2) gemessen.

Die Softwareanalyse der Rohdaten erfolgte mittels ModFit<sup>R</sup> LTV 2.0 (Varity Software).

Bei der Durchflusszytometrie mit Propidium Iodid zeigte sich eine signifikante S-Phasen-Progression IE2 infizierter Zellen (Abb.15, 16 und Abb.17).

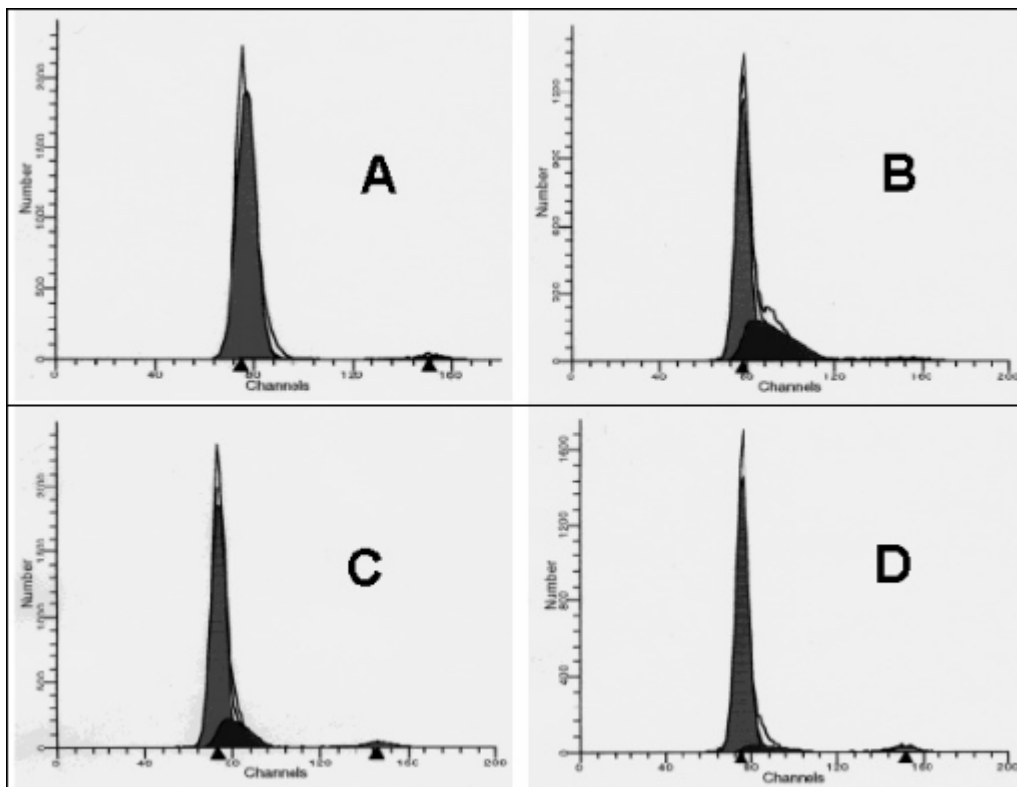


Abb. 15: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (PI-Färbung); A: nicht infizierte Zellen; B: stimulierte, nicht infizierte Zellen; C: nicht stimulierte, IE2 transfizierte Zellen; D: nicht stimulierte, lacZ transfizierte Zellen

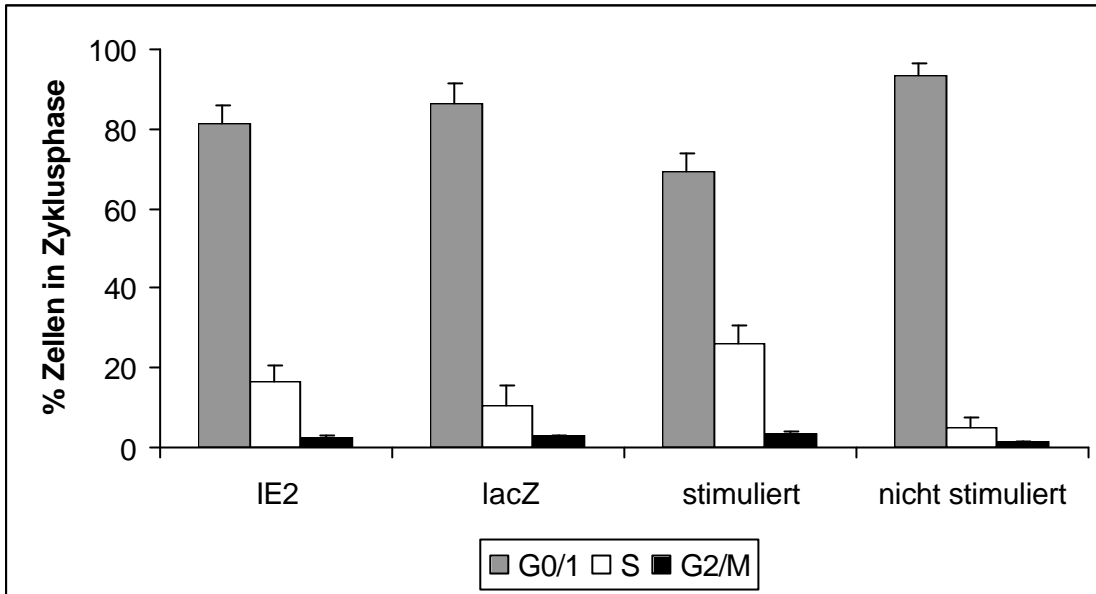


Abb. 16: Quantifizierung des prozentualen Anteils der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase

	IE2	LacZ	stimulierte Zellen	nicht stimulierte Zellen
Go-Phase	93,5	81,2	86,5	69,4
S-Phase	16,4	10,7	26,0	5,0
G2/M-Phase	2,4	2,9	3,6	1,6

Abb. 17: Anteil der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen in Prozent

### 3.9 Untersuchung der Regulation distinkter Zellzyklusgene mittels Westernblot

Western Blotting mit Antikörpern gegen das G1-Phasen Cyclin Cyclin D1 und dessen prädominanten Bindungspartner Cdk 4 sowie gegen das G1/S-Phasen Markerprotein PCNA (alle: Santa Cruz Biotech.) wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Pro Konstrukt wurde 40 µg Protein eingesetzt.

### 3.9.1 Nachweis der Induktion des Cyclin D durch IE2

Mit einem Westernblot wurden die 24 h, 36 h und 42 h nach Infektion der CASMCs gewonnenen Proteine auf Expression des für die Einleitung der S-Phase entscheidenden Cyclin D1 untersucht.

Es wurde eine Proteinkonzentration von 40µg eingesetzt, der 1. Antikörper Cyclin D1 (Maus, Santa Cruz) wurde in einer Konzentration von 1:500 aufgetragen, der 2. Antikörper in einem Verhältnis von 1:5 000.

Als Positivkontrolle wurde das Protein Cyclin D1 (Santa Cruz) 1:100 verdünnt, als Negativkontrolle CASMC verwendet.

Eine deutlich ausgeprägte WB Bande im Bereich 24 h p.i. durch Ad-IE2 zeigt eine Induktion des in der G1-Phase entscheidenden Zellzyklusregulatoren Cyclin D1 durch Ad-IE2 und ist auch 72 h p.i. noch signifikant nachweisbar.

Die Proteingewinnung wurde wiederholt und andere Westernblots zeigten ein vergleichbares Ergebnis.

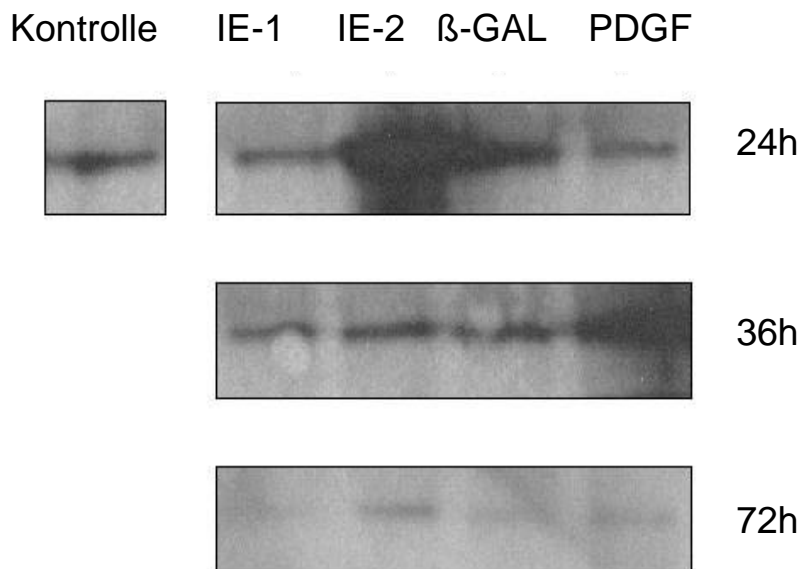


Abb. 18: Western Blot gegen Cyclin D1 (61kD), die Induktion des Cyclin D1 durch Ad-IE2 24 h p.i. ist auch 72 h p.i. noch signifikant nachweisbar

### 3.9.2 Nachweis der Induktion der CDK4 durch IE2:

Die dem Cyclin D1 entsprechende Kinase wurde ebenfalls untersucht. Analog dem vorherigen Westernblot mit dem Cyclin D1 wurde eine Proteinkonzentration von 40 µg eingesetzt, der 1. Antikörper CDK4 (Kaninchen, Santa Cruz) wurde in einer Konzentration von 1:500 aufgetragen, der 2. Antikörper in einem Verhältnis von 1:5000

Als Positivkontrolle wurde das Zellzyklusprotein CDK4 ( Santa Cruz) 1:100 verdünnt, als Negativkontrolle CASMC verwendet.

In der Abb. 19 zeigt sich deutlich die erhöhte Expression des CDK4 bei Ad-IE2 infizierten Zellen va. 36 h und 72 h p.i.

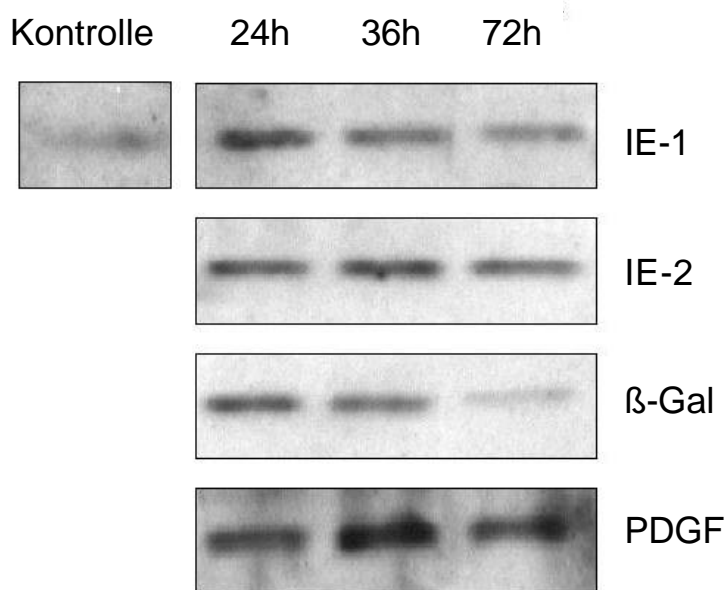


Abb. 19: Western Blot gegen CDK4 (34kD) mit erhöhter Expression des CDK4 bei Ad-IE2 infizierten Zellen va. 36 h und 72 h p.i. im Vergleich zur Kontrolle

### 3.9.3 Nachweis der Induktion des PCNA (proliferating cell nuclear antigen) durch IE2

Es wurde eine Proteinkonzentration von 40 µg eingesetzt, der 1. Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:1 000 aufgetragen, der 2. Antikörper Maus in einem Verhältnis von 1:5 000. Als Negativkontrolle wurden CASMC verwendet.

Im Western Blot zeigte sich bei IE2 transduzierten Zellen eine deutliche Induktion des PCNA (proliferating cell nuclear antigen), das in der frühen G1 und S-Phase des Zellzyklus synthetisiert wird und als Marker für Zellproliferation dient (Abb.20 ).

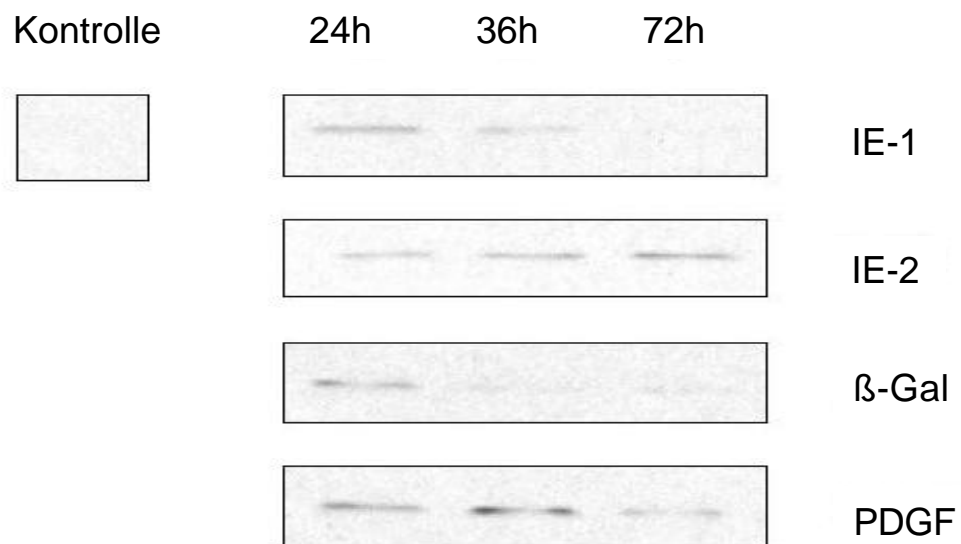


Abb.20: Western Blot gegen PCNA (34kD) mit deutlicher Induktion des PCNA bei IE2 transduzierten Zellen bis 72 h p.i.

### 3.10 Induktion des NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktors durch IE2 in CASMCs

In arretierten und synchronisierten CASMCs erfolgte die Cotransfektion von jeweils IE1, IE2 und als Kontrolle PON mit NF- $\kappa$ B. 48 h nach Transfektion (p.t.) wurden die Zellen lysiert und im Luminometer die Luciferase-Expression gemessen. Weiterhin wurden arretierte CASMCs mit NF- $\kappa$ B transfiziert und 6 h p.t. mit hCMV MOI 1 infiziert und nach 24 h p.t., 48 h p.t. und 72 h p.t. lysiert. Als Positivkontrolle wurden NF- $\kappa$ B transfizierte arretierte CASMCs mit serumhaltigem Medium inkubiert und 48 h p.t. Protein purifiziert ( Abb.21).

No	DNA 1	DNA 2	Infektion	Lysierung
1	KB	PON		48h p.t.
2	KB	IE-1		48h p.t.
3	KB	IE-1		48h p.t.
4	KB	IE-2		48h p.t.
5	KB	IE-2		48h p.t.
6	KB	Serum		48h p.t.
7	KB	∅ Serum		48h p.t.
8	KB	∅ Serum	hCMV MOI 1 6h p.t.	24h p t
9	KB	∅ Serum	hCMV MOI 1 6h p.t.	48h p.t.
10	KB	∅ Serum	hCMV MOI 1 6h p.t.	72h p.t.

Abb. 21: Versuchsablauf der Cotransfektion zur Untersuchung der Induktion des NF- $\kappa$ B durch IE1, IE2 und hCMV

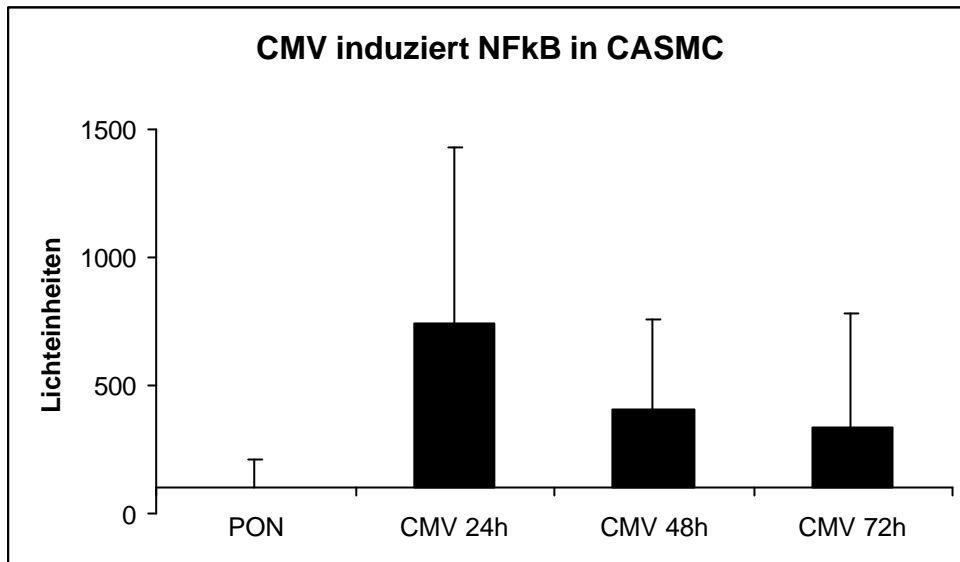


Abb.22: Luciferaseassay mit hCMV infizierten CASMC

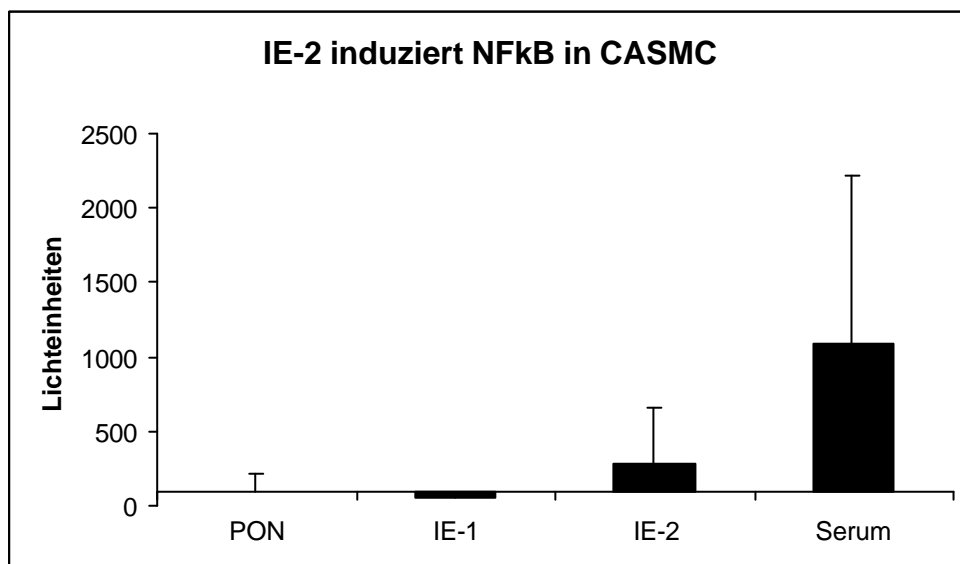


Abb.23: Luciferaseassay mit IE1, IE2 und PON transfizierten CASMC

Abb. 22 und 23 zeigen eine Induktion des NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktors durch IE2 und hCMV in CASMCs.

NF- $\kappa$ B ist als Transkriptionsfaktor für die Regulation der Transkription vieler für die Zellzyklusregulation entscheidender Gene zuständig. Die Aktivierung erfolgt in einer Ablösung des NF- $\kappa$ B von seinem Inhibitor im Cytoplasma. Der aktivierte NF- $\kappa$ B gelangt in den Nukleus, wo er die Transkription der Gene erhöht.



### 3.11 Kein Hinweis für Zytotoxizität durch Infektion der CASMCs mit Ad IE1 und Ad- IE2 mittels LDH Assay

Im LDH Assay zeigte sich keine Zunahme des Zytotoxizität nach adenoviraler Infektion der CASMCs mit einer MOI von 100 im Vergleich zu Ad- $\beta$ Gal oder nicht infizierten CASMC (Abbildung 23). Die LDH-Aktivität wird 1 Tag, 2 Tage, 3 Tage, 4 Tage, 5 Tage und 6 Tage nach der Infektion der CASMC bestimmt. Die Messung der Absorbtion erfolgte bei 490 nm, die Referenzwellenlänge betrug 630 nm.

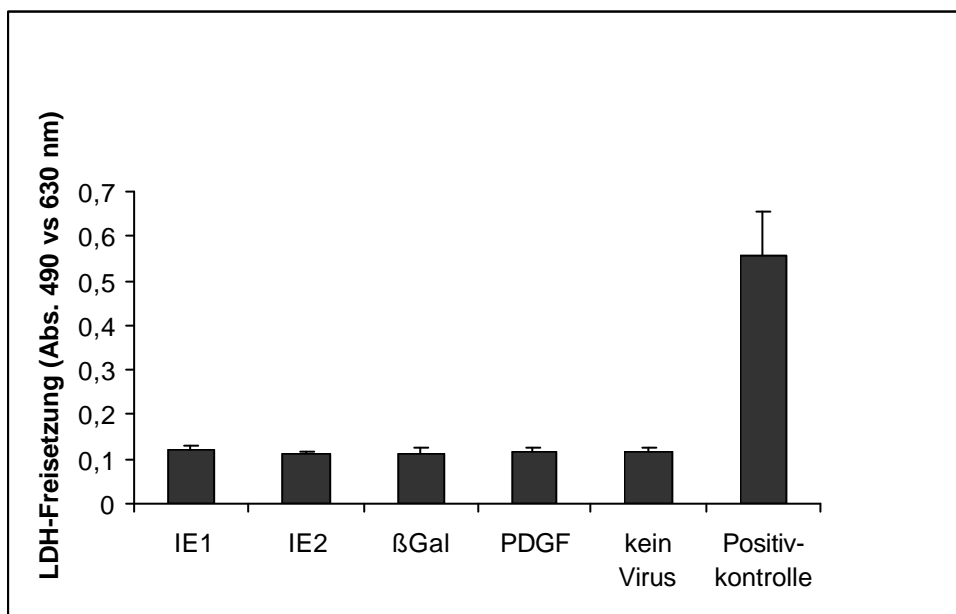


Abb.24: LDH Assay mit Ad-IE1, Ad-IE2 und Ad- $\beta$ Gal infizierter CASMC

### 3.12 Kinaseassay zum Nachweis der Aktivität des Cyclin A/ CDK 2 Komplexes

Die Kinaseaktivität des Cyclin A/ CDK 2 Komplexes wurde mittels Kinaseassay bestimmt. Phosphoryliertes Histon H1 als Maß der Kinaseaktivität wurde als 30 kD große Doppelbande im SDS-PAGE detektiert.

Der Kinaseassay zum Nachweis der Aktivität des Cyclin A/ CDK 2 Komplexes, der essentiell für den G1/S-Phasen-Übergang ist, zeigte im Vergleich zu den Kontrollen die höchste Aktivität bei IE2 transduzierten Zellen.

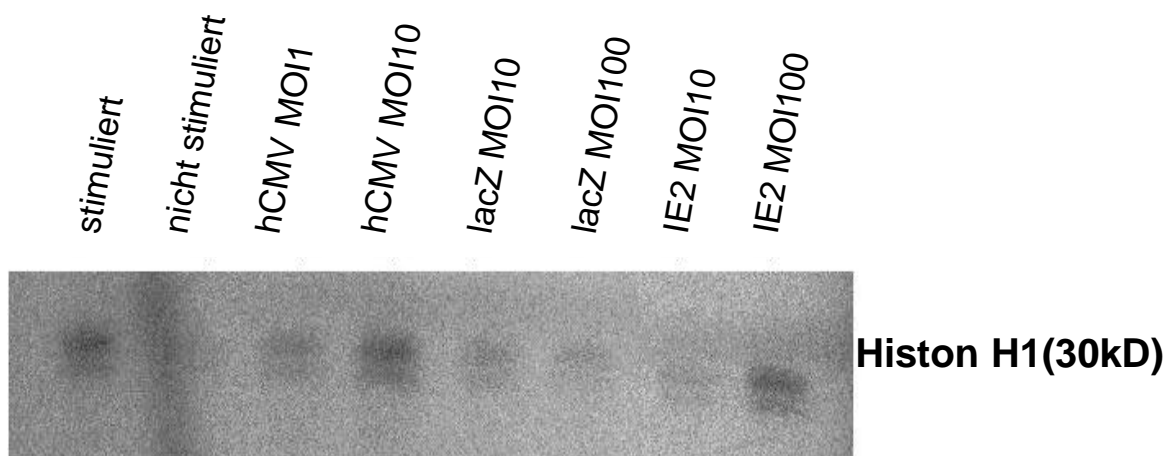


Abb. 25: Kinaseassay für den Cyclin A/ CDK 2 Komplex

## 4 Diskussion

### Interaktion von hCMV mit anderen atherogenen Risikofaktoren

Die koronare Restenose nach Katheterintervention ist nach wie vor ein zentrales Problem in der interventionellen Kardiologie. Neben den bekannten Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit wie Alter, Nikotinabusus, Diabetes, Hyperlipidämie, Adipositas, Hypertension und positive Familienanamnese<sup>60</sup> wurden in den letzten Jahren insbesondere infektiöse Ursachen, die auch mit der Arterioskleroseentstehung im allgemeinen in Verbindung gebracht werden, als Risikofaktor der Restenosebildung diskutiert. Besonders zwei Erreger fanden hierbei große Beachtung: das Bakterium *Chlamydia pneumoniae* und das humane Cytomegalievirus (hCMV)<sup>126</sup>. Allen Risikofaktoren gemeinsam ist die konsekutive Schädigung des Gefäßendothels<sup>51</sup>.

1978 zeigte Fabricant et al im Rahmen von experimenteller Infektion von Hühnern mit dem Marek's Disease Virus (MDV) eine Assoziation mit der Entwicklung von Arteriosklerose in Koronararterien und großen Gefäßen bei Hühnern<sup>55</sup>. Die aufgetretenen Plaques, ähnlich denen bei humaner Arteriosklerose, waren charakterisiert durch extensive Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßintima. Sie zeigten weiterhin, dass SMCs nach Infektion mit MDV in vitro Cholesterol und Cholesterinester akkumulierten<sup>56</sup>, nicht infizierte Hühner entwickelten keine arteriosklerotischen Plaques, unabhängig von ihren Cholesterolspiegel. Virusinduzierter Arteriosklerose konnte erfolgreich durch vorherige Immunisierung mit einem verwandten Truthahn Herpesvirus vorgebeugt werden<sup>56</sup>. Die hohe CMV Durchseuchung in der Bevölkerung, der Nachweis von Einschlußkörperchen des CMV in Endothelzellen bei menschlicher Infektion sowie von CMV Antikörper und Nucleinsäuresequenzen in SMCs von Arteriosklerosepatienten<sup>127 129</sup> und Vaskulitis bei schweren CMV-Infektionen implizierten einen causalen Zusammenhang zwischen hCMV und Arteriosklerose. Besonders das Auftreten von schwerer Arteriosklerose bei organtransplantieren immunsuprimierten Patienten mit CMV-Infektion<sup>128</sup> unterstreicht die atherogene Potenz bei Menschen.

Mittlerweile stellt eine Infektion mit hCMV eine der Hauptursachen für ein Transplantatversagen jenseits des ersten Jahres aufgrund einer

Transplantatvaskulopathie bei Organtransplantaten dar <sup>107 71 180</sup>, die vom zeitlichen Ablauf sowie morphologisch ein ähnliches Bild wie bei der Restenose zeigt (akzelerierte Arteriosklerose).

Durch die Beobachtung der Interaktion des IE2 mit p53 bei Atherektomieproben von Restenosepatienten nach Angioplastie <sup>186 231</sup> entstand die Theorie der Proliferation der SMCs und damit Induktion der Restenose durch Hemmung der Apoptose. HCMV ist mittlerweile ein unabhängiger Risikofaktor für Restenose nach Artherektomie <sup>231</sup>. Patienten mit hohem CMV Antikörpertiter haben eine hohe Prävalenz für koronare Gefäßerkrankungen und zeigten eine größere Restenoserate als Patienten mit niedrigen Antikörpertitern <sup>16</sup>. HCMV gilt bereits als unabhängiger Risikofaktor für Mortalität bei Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung <sup>136</sup>.

Zahlreiche Interaktionen des hCMV mit der Zelle bewirken dessen atherogene Potenz. Entzündung kann zu einem atherogenen Prozess führen <sup>158 196</sup>. CMV scheint einer der Stimuli zu sein, die einen Entzündungsprozess triggern können <sup>235</sup>. CMV verfügt über ein proinflammatorisches Potential durch Interferenz mit proinflammatorischer Proteinexpression <sup>35</sup>. Chronische Entzündung, angezeigt durch erhöhtes CRP <sup>136</sup> oder Interleukin 6 <sup>15</sup> nach CMV-Infektion, gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität bei Herzgefäßerkrankungen, dessen prädiktiver Aussagewert in Bezug auf Mortalität sogar größer war als der einer Anzahl traditioneller Risikofaktoren wie Diabetes, Hyperlipidämie, Hypertension und Nikotinabusus <sup>136</sup>. Da die Entzündungsantwort individuell, je nach Immunstatus, unterschiedlich ausfallen kann, variiert das Ausmaß der Entzündung und damit das Risiko einer Herzkranzgefäßerkrankung <sup>235</sup>, was wiederum die Studienergebnisse, die keinen atherogenen Effekt des CMV zeigen <sup>3 46</sup>, erklärt. Somit scheint die Provokation der Entzündungsantwort im Wirt ein möglicher atherogener Wirkmechanismus des hCMV zu sein.

Neben der inflammatorischen Wirkung kann eine hCMV-Infektion eine prokoagulatorische Wirkung auf Endothelzellen ausüben <sup>205 52 154 75 183 54 207 184</sup>, führt zu einer gesteigerten Aufnahme von oxidierten LDL in die Zelle <sup>230</sup>, kann Apoptose hemmen <sup>185 186 51 200 18 234 201 30</sup> und induziert u.a. den für Zellproliferation bedeutenden Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B <sup>187 108 226</sup>. Des Weiteren hat es einen stimulierenden Einfluss auf Wachstumsfaktoren und Cytokine <sup>31 233 76 169 171</sup>.

## Ziel der Arbeit

Die Proliferation und Migration der CASMC stellt eine zentrale pathophysiologische Komponente der In-Stent-Restenose dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Interaktionen zwischen hCMV und seinem Immediate Early Genprodukt IE2 mit der Induktion des eukaryonten Zellzyklus in CASMC untersucht. Der Zellzyklus spielt eine zentrale Schlüsselrolle bei Zellwachstum und Zellteilung. Viren können regulativ auf den eukaryonten Zellzyklus einwirken. DNA Viren benötigen die zelluläre Maschinerie ihres Wirtes, um für eine erfolgreiche Infektion ihre eigene virale DNA zu replizieren<sup>20 118 44</sup>. Deshalb besitzen DNA Viren wie das Adenovirus, das Simian Virus 40 und das humane Papillomavirus die Fähigkeit, mit der zellulären Replikationsmaschinerie zu interferieren, um für ihre eigene virale Replikation optimale Bedingungen zu erzielen. Um die benötigten zellulären Faktoren zu erhalten, sind die Viren, deren Wirtszellen typischerweise ruhende Zellen sind, in der Lage, die Zellen aus der G<sub>0</sub>-Phase in den Zellzyklus eintreten zu lassen<sup>140</sup>.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass auch hCMV in den zellulären Metabolismus seines Wirtes, wie die Stimulation der zellulären DNA, RNA und Protein-Synthese, eingreift<sup>6 42 65 66 193 221 7 188 93</sup>.

Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Fragestellung, ob eine Cytomegalieinfektion bzw. distinkte virale Genregionen des Cytomegalievirus zu einer Induktion des Zellzyklus in humanen koronaren glatten Muskelzellen führen. Wir konnten zeigen, dass hCMV und IE2 den Eintritt arretierter Zellen in die S-Phase induziert. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es überdies, eine Interaktion des IE2 mit dem G<sub>1</sub>-Phase Cyclin D zu dokumentieren.

## HCMV-Infektion bewirkt eine S-Phasen Progression in CASMCs

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von hCMV mit dem Zellzyklus von CASMCs zu charakterisieren. Proliferierende Zellen wurden mittels <sup>3</sup>H-Thymidinkinaseassay, BrDU-ELISA-Proliferationsassay sowie Propidium Iodid Färbung im FACS detektiert.

Sowohl im <sup>3</sup>H-Thymidinassay, im BrDU-ELISA-Proliferationsassay, als auch im Durchflusszytometer konnte eine gesteigerte Zellzyklusprogression in die SPhase

nach Infektion serumarretierter Zellen mit hCMV festgestellt werden. Wir konnten somit zeigen, dass hCMV einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von CASMCs ausüben kann. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der aktuellen Literatur. So konnten auch Yonemitsu, Kaneda et al in vitro und in vivo eine Proliferation von glatten Muskelzellen nachweisen<sup>224</sup>.

Weiterhin gibt es eine Reihe von Belegen, die auf die Fähigkeit des hCMV hinweisen, mit der Zellzyklusmaschinerie zu interferieren:

Die Protoonkogene c-myc, c-fos und c-jun werden in infizierten Zellen rapide hochreguliert<sup>17 133 81</sup>. Eine virale Infektion scheint verschiedene zelluläre S-Phase Gene für die DNA Polymerase  $\alpha$ , Dihydrofolat Reduktase (DHFR) und Thymidinkinase (TK) zu aktivieren, sowie die Transaktivationsaktivität von E2F und die Expression der Cycline E, A und CDK2 Proteine zu induzieren<sup>19 85 209</sup>. HCMV infizierte Zellen weisen außerdem ein erhöhtes Niveau an hyperphosphoryliertem pRb, einem zentralen Zellzyklusregulator, der den G1/S-Übergang leitet. Die Phosphorylierung von pRb im speziellen, dient als ein G1/S Checkpoint, von dem der S-Phasen Eintritt und die Progression des Zellzyklus abhängt<sup>212</sup>.

#### Überexpression von IE2 resultiert in einer S-Phase Progression von CASMCs

Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit war die Untersuchung, ob eine Überexpression des Immediate Early Gens IE2 allein eine S-Phasen Progression von quieszenten CASMC bewirkt. Die Immediate Early Gene spielen bei der viralen Replikation eine essentielle Rolle. Sie werden sogar während einer abortiv verlaufenden Infektion exprimiert, in der charakteristischerweise Early oder Late Gene nicht exprimiert werden und keine virale Replikation erfolgt. Da sie ohne virale und zelluläre Faktoren exprimiert werden können, kämen sie in Frage, um in Zellen, die normalerweise in der G0-Phase sind, den Zellzyklus zu aktivieren mit dem Ziel sich der für zelluläre Replikation essentiellen eukaryonten Proteine für die eigene virale Replikation zu bedienen<sup>137</sup>. Dadurch könnte die durch Proliferation der Zellen entstandene Restenose als Folge der viralen Infektion entstehen.

Zusätzlich verfügen Immediate Early Proteine IE1 und IE2 über ein ausgeprägtes transaktivierendes Potential eukaryonter Promotoren<sup>74</sup>.

Bekannt ist, dass eine Expression von IE1 und IE2 auf den normalen Zellzyklus in asynchron zyklischen Zellen einwirken kann. So vermag IE2 den Eintritt in den Zellzyklus in ruhenden Zellen zu bewirken und den Austritt der Zellen aus dem

Zellzyklus zu verzögern<sup>23</sup>. Weiterhin wurde in vitro eine Zunahme des Prozentsatzes der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus beobachtet<sup>188</sup>.

Um zu untersuchen, ob die Überexpression des Immediate Early Genprodukts IE2 eine Zellzyklusprogression in CASMCs induziert, wurde ein rekombinantes replikationsdefizientes adenovirales Expressionssystem kloniert, welches das CMV-Immediate Early Gen IE2 auf hohem Niveau exprimiert. Dazu wurde das CMV Immediate Early Gene IE2 in einen adenoviralen Shuttlevektor einkloniert. Als Kontrolle wurde ein Expressionsvektor für lacZ kloniert. Die rekombinante Expression von IE2 wurde mit Western Blot und indirekter Immunfluoreszenz überprüft. In einem anderen Zellsystem, in dem das Virus replikationsfähig ist (293 Zellen), wurde der Titer mit einem Plaque Forming Assay festgestellt.

Mit indirekter Immunfluoreszenz wurde die Expression des Immediate Early Proteins geprüft und im Weiteren eine geeignete MOI ausgewählt, mit der die Zellen infiziert werden sollten, um einerseits eine adäquate Expressionsrate zu erzielen, andererseits den cytopathischen Effekt so gering wie möglich zu halten. Mit einem LDH Zytotoxizitätsassay wurde ein akzelerierter Zelltod durch die Infektion der CASMCs mit hCMV und dem rekombinanten Adenovirus ausgeschlossen. Der Einsatz eines lacZ cDNA rekombinanten replikationsdefizienten Adenovirus, das das  $\beta$ -Galaktosidasegen exprimiert, zeigte den Einfluss des rekombinanten adenoviralen Vektors auf das Proliferationsverhalten der Zellen und diente als Negativkontrolle. Eine weitere Negativkontrolle stellten arretierte, nicht infizierte Zellen dar. Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem Wachstumsfaktor PDGF stimuliert wurden.

Die Ergebnisse der Experimente belegen, dass das IE2-Protein sowohl im <sup>3</sup>H-Thymidinassay als auch im Durchflusszytometer eine S-Phasen Progression der Zellen vermittelt.

Im <sup>3</sup>H Thymidinassay ließ sich eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Nukleotidinkorporation in Ad-IE2 infizierten Zellen feststellen. In der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodidfärbung zeigte sich ein erhöhter Anteil von Ad-IE2 infizierten Zellen in der S-Phase. Analog zu diesen Ergebnissen gelang im Western Blot der Nachweis der erhöhten Induktion des S-Phasen Markerproteins PCNA.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hCMV und dessen Immediate Early Genprodukt IE2 den Eintritt der Zelle in die S-Phase induzieren und demzufolge zu einer erhöhten DNA-Synthese führen. Mittels unabhängiger Assays, der Thymidininkooperation und Durchflusszytometrie, zeigte sich gegenüber Kontrollen eine erhöhte DNA-Synthese in hCMV und Ad-IE2 infizierten Zellen. Im Westernblot erfolgte der Nachweis der erhöhten Induktion des S-Phasen Markerproteins PCNA. Eine Progression in die S-Phase wird durch eine im Westernblot festgestellte erhöhte Expression des PCNA sowie durch durchflusszytometrische Ergebnisse mit einem erhöhten Anteil an Ad-IE2 infizierten Zellen in der S-Phase detektiert. Es konnte aber kein Eintritt in die G2- und M-Phase gezeigt werden .

In der Literatur sind mittlerweile entsprechende Ergebnisse beschrieben. Zhou, Yu, et al wiesen in mit hCMV infizierten SMCs, in denen nur die IE Genprodukte des hCMV exprimiert wurden, eine gesteigerte Proliferation und eine erhöhte Migrationskapazität nach <sup>233</sup>.

#### Molekulare Mechanismen bei Interaktion des HCMV und dessen IE-2 mit Zellzyklus

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, molekulare Mechanismen aufzuzeigen, über die das hCMV bzw. das IE2 mit dem Zellzyklus interagieren. DNA-Viren verwenden Onkogenprodukte, die die Wirkung des p53 und von Mitgliedern aus der Rb Proteinfamilie inaktivieren <sup>140</sup>. Auch von IE2 Genprodukten sind Interaktionen mit dem p53 und Rb Mitgliedern bekannt.

Wir untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen den Genprodukten IE1 und IE2 und Cyclinen.

Im Westernblot zeigte sich eine erhöhte Expression des G1-Phasen Komplexes Cyclin D1 und CDK4 bei hCMV und Ad-IE2 infizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Somit konnte ein möglicher Mechanismus der Interaktion des hCMV und IE2 mit Zellzyklusgenen gefunden werden. Weiterhin zeigte die Kinaseaktivität des für den G1/S-Phase Übergangs essentiellen Cyclin A/CDK2 Komplexes, der mittels eines Kinaseassay bestimmt wurde, bei IE2 transduzierten Zellen die höchste Aktivität auf.



Die parallel durchgeführten Untersuchungen mit Ad-IE1 zeigten keine Auswirkungen auf die Expression des Cyclin D oder CDK4 oder auf die Kinaseaktivität des Cyclin A/ CDK2 Komplexes.

Es bleibt jedoch weiterhin unklar, ob die nachgewiesene S-Phasen-Zunahme der Zelle als Beweis einer Proliferation genügt, ob die Zelle also in der Tat fähig ist, den Zellzyklus weiter zu durchlaufen oder ob sie vielleicht bereits innerhalb der S- Phase oder später arretiert wird.

In unseren durchflusszytometrischen Untersuchungen mit Propidiumiodid konnte kein Eintritt der Zellen in die G2 und M Phase beobachtet werden. Somit konnte im Rahmen unserer Untersuchung keine vollständige Progression des Zellzyklus nach Infektion beobachtet werden. Es ist denkbar, dass CMV nur einen Eintritt in die S- Phase bewirkt und es dann aber zu keiner weiteren Zellzyklusprogression durch andere atherogene Faktoren kommt.

Belege hierfür finden sich in der Literatur. So lässt eine Studie von Wiedebusch et al vermuten, dass eine IE2 Expression zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt<sup>214</sup>, was im Einklang steht mit einigen Studien, die bei hCMV infizierten humanen Fibroblasten einen Zellzyklusarrest in der späten G1-Phase oder G2/M-Übergang nachwiesen<sup>20 93 118 44</sup>. Murphy et al stellten bei allen von ihnen untersuchten hCMV permissiven Zellen, darunter auch SMC, nach Transduktion oder Transfektion und Expression von IE2 eine Blockierung im Zellzyklus fest<sup>137</sup>. Die Zahl der Zellen, die sich in der S-Phase befanden, stieg zwar signifikant an, die Zellen waren aber nicht fähig, sich zu teilen. Dieser Effekt auf die S-Phase war nicht bei IE1 Expression erkennbar. Auch in unseren Experimenten ließ sich kein Effekt von IE1 auf eine Erhöhung des Anteils der in der S-Phase befindlichen Zellen feststellen.

Ein S-Phaseneintritt und ein konsekutiver Halt des Zellzyklus in der S-Phase könnte dem Virus dazu dienen, die zellulären Faktoren für seine eigene virale DNA Replikation zu benützen<sup>137</sup> ohne Konkurrenz zur zellulären Replikation.

Andererseits gibt es Belege für proliferationsinduzierende Effekte von hCMV.

IE2 vermag die Aktivität des E2F zu induzieren. Durch die Induktion der E2F Aktivität sollte die IE2 Expression zu einer Induktion verschiedener für die zelluläre DNA Replikation entscheidende Gene, wie DHFR und TK Gene führen, da diese durch E2F reguliert werden. Auch besitzt IE2 die Fähigkeit, Cyclin E-CDK2 und CyclinA-CDK2 Komplexe zu aktivieren<sup>19</sup>, welche für die Progression von der G1-Phase in die

S-Phase von Bedeutung sind. IE2 ist ein potenter Transkriptionsaktivator, der mit Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert<sup>119 24 80 97 111 120</sup>. Von Stammformen des IE2-Proteins wurde berichtet, sie interagieren in vitro mit Rb<sup>79 182</sup>, p53<sup>186</sup>, CREP<sup>111</sup>, PML<sup>4</sup>, TBP, Sp-1<sup>120</sup>, TFIIB<sup>24</sup>, *c-jun*<sup>174</sup> und TAFII-130<sup>80</sup>. IE2, nicht aber IE1, interagiert mit p53 in vitro und in vivo<sup>18 185 200</sup> und bewirkt dadurch einen Funktionsverlust von p53<sup>185 200</sup>. Wiebusch und Hagemeyer haben sogar gezeigt, dass das IE2-Protein den Zellzyklus unabhängig von p16INK4, Rb, p53 oder p21CIP beeinflusst<sup>214</sup>.

### Zelluläre und humorale Effekte des hCMV

Die unspezifischen Abwehrmechanismen des angeborenen zellulären Immunsystems werden u.a. durch Phagozyten und natürliche Killerzellen, die spezifische Immunantwort des erworbenen Immunsystems v.a. durch Lymphozyten und spezifische Antikörper vermittelt. Natürliche Killerzellen (NK) sind eine wichtige Komponente der zellulären angeborenen Immunabwehr. Sie sind in der frühen Phase der Infektion wichtig. Bei fehlender Expression von bestimmten Zelloberflächenmolekülen, den Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I, werden die infizierten Zellen durch NK Zellen erkannt und abgetötet. Aktiviert werden die NK Zellen durch Interferone, die meist von den virusbefallenen Zellen selbst gebildet werden<sup>2</sup>.

Die spezifische Abwehr ist charakterisiert durch hohe Spezifität sowie einer Fähigkeit der Ausbildung eines Gedächtnisses. Zytoplasmatische T Lymphozyten (CTL) sind Teil des spezifischen Immunsystems und erkennen virusinfizierte Zellen durch eine direkte Interaktion zwischen T-Zell Rezeptor am zytoplasmatischen T Lymphozyt<sup>239</sup> und dem viralen Peptid, das durch das MHC Klasse I Molekül an der Oberfläche der infizierten Zelle präsentiert wird<sup>144</sup>.

Bei der humoralen Immunabwehr werden nach Erstinfektion spezifische IgM Antikörper gebildet, die für 3-4 Monate persistieren. Wenige Wochen später treten IgG Antikörper auf, die lebenslang bestehen.

Eine primäre CMV-Infektion verläuft bei Immunkompetenten meist subklinisch. Komplette CMV Freiheit wird nur selten wieder erreicht. Das hCMV ist ein Virus, das meist latent in seinem Wirtsorganismus verweilt und dort jahrelang persistiert<sup>155</sup>. Reaktivierung kann jedoch später erfolgen, je nach Immunstatus des Wirtes. Daher spielt das Immunsystem des CMV Trägers eine entscheidende Rolle. Eine CMV-

vermittelte Entzündung basiert auf einer Störung der immunologischen Balance innerhalb des betroffenen Gewebes<sup>170</sup>. Da schwere Infektionen gewöhnlich bei Individuen mit gestörter zellulärer Immunität, wie HIV Erkrankten oder Transplantatempfängern, auftreten, scheint dieser Teil der Immunabwehr eine besondere Stellung einzunehmen<sup>146 228</sup>.

Es gibt eine Reihe zellulärer und humoraler Funktionen des Organismus, die zu einer schützenden Immunität gegen CMV führen:

CMV spezifische CD8 T Lymphozyten konnten identifiziert werden, die als immunologische Haupteffektoren die Virusreplikation in vivo limitierten<sup>156</sup>. Der Transfer von HCMV spezifischen T-Zell-Klonen erzielte eine Verhinderung schwerer Erkrankungen allogener Knochenmarkempfänger<sup>210</sup>. Zur effizienten Rekonstitution der CD8 Zellen ist eine ausreichende Anzahl an CD4 Helfer T Lymphozyten notwendig.

Die humorale Antwort hat ihre Bedeutung v.a. in den transplazentär übertragenen Antikörpern, die den Schweregrad infizierter Neugeborener modifizieren<sup>222</sup>, sowie bei organtransplantierten Patienten, deren Mangel an CMV spezifischer Immunkompetenz mit schweren klinischen Manifestationen korreliert und einer erhöhten Mortalität in der posttransplantären Periode<sup>57 58 181</sup>. Auch bei Knochenmarktransplantationen zeigte sich ein besseres Outcome bei CMV immunen Patienten<sup>147</sup>.

Insgesamt führen zelluläre und humorale Funktionen zu einer schützenden Immunität gegen die CMV-Infektion.

Um mit dem Wirt coexistieren zu können, hat das CMV verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Immunerkennung des Wirtes zu entgehen<sup>215</sup> und sogar um spezifische Immunfunktionen für Reaktivierung und Verbreitung des Virus zu benutzen<sup>105</sup>. Diese Fähigkeit resultiert aus der Induktion eines latenten Status der Infektion, Ausnützung immunologisch privilegierter Gewebe wie Speicheldrüsen für die Replikation, die eine insuffiziente Anzahl an MHC Klasse I Moleküle exprimieren, um CD 8 Zellen zu triggern und aus der Expression von Genen, die mit dem Immunsystem interferieren<sup>132</sup>. Bestimmte Glykoproteine des CMV interagieren zB. mit den MCH Klasse I Glykoproteinen, Moleküle, die dem Immunsystem die infizierten Zellen signalisieren, indem sie neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle zerstören<sup>95 216</sup> oder die Moleküle im endoplasmatischen Retikulum zurückhalten und damit die Antigenpräsentation der viralen Produkte auf der Wirtszellmembran

verhindern<sup>5 96</sup>. HCMV codiert ein weiteres Glykoprotein, das US 6, das den Transporter für die Antigenpräsentation blockiert<sup>215</sup>. CMV Matrix Protein pp65 katalysiert die Phosphorylierung von IE1, wodurch die IE1-Antigen Präsentation so beeinflusst wird, dass CTL in vitro nicht mehr aktiviert werden<sup>69</sup>. HCMV blockiert auch die Wirkung der natürlichen Killerzellen, indem es ein MHC Klasse I Äquivalent codiert, das die Expression von HLA ( Human Leucocyte Antigen) Molekülen hochreguliert, die an die hemmenden Rezeptoren an der Zelloberfläche binden<sup>198</sup>.

HCMV bewirkt einen metabolischen Defekt in Monozyten und Lymphozyten, wodurch die Cytokinproduktion sowie die Antwort auf Cytokine gestört werden<sup>98</sup>. Weiterhin beeinflusst hCMV Zelladhäsionsmoleküle, erhöht proinflammatorische Cytokine und Wachstumsfaktoren und hemmt Apoptose durch Interferenz mit p53.

HCMV-infizierte Zellen könnten durch virusinduzierte Hemmung der Apoptose geschützt werden<sup>234</sup>. Der ruhende, nicht replizierende Virus in einer latent infizierten Zelle könnte die proinflammatorische Aktivität des Immunsystems verwenden, um aktiviert zu werden und/oder zu disseminieren<sup>170</sup>.

### Prophylaxe und Therapie

Die Entwicklung einer effektiven Impfstrategie könnte den Schweregrad einer CMV-Infektion reduzieren<sup>147</sup>. Zahlreiche Impfungen wurden in den letzten Jahren entwickelt und getestet, der Schutz war jedoch geringer als nach einer natürlichen Infektion<sup>147</sup>. Aktuelle Impfstrategien verwenden Vektoren, die sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort stimulieren<sup>152</sup>.

Passive Immunisierung kann in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Standard Immunglobuline, die aus dem Blut und Plasma von Spendern mit CMV Antikörpern stammen, und Hyperimmunglobuline von Spendern mit hohen Antikörpertitern. Passive Immunisierung konnte den Schweregrad einer CMV-Infektion bei Organtransplantierten reduzieren<sup>177</sup>, und Meta-Analysen zeigten eine Wirksamkeit von CMV Immunglobulinen in der Prävention und Therapie einer CMV-Infektion von Organtransplantierten<sup>218</sup>. Weiterhin konnten Hyperimmunglobuline CMV Erkrankung und Infektion bei aggressiv immunsupprimierten Herztransplantatempfängern vorbeugen<sup>102</sup> und es gibt bereits Hinweise, dass Hyperimmunglobuline Posttransplant-Arteriosklerose vorbeugen<sup>102</sup>.

Neue Immuntherapiestrategien beinhalten T-Zell-Klon-Transfer von isolierten virusspezifischen CD8 und CTL Klone aus dem Blut immunkompetenter allogener Stammzellspender bei Patienten nach Transplantation <sup>72</sup>.

Die prophylaktische Therapie wird kontrovers diskutiert.

Die verwendeten Medikamente hemmen die hCMV DNA-Polymerase, so dass es zu einer signifikanten Reduktion der CMV DNA-Synthese kommt <sup>170</sup>.

Das Nukleosidanalogen Ganciclovir (GCV) und das Pyrophosphatanalogen Foscarnet (PFA) sind einerseits wirksame Medikamente, zeigen jedoch eine schlechte orale Bioverfügbarkeit, wodurch häufig Hospitalisierung nötig ist. Sie haben eine niedrige Potenz, eine dosislimitierende Toxizität und begünstigen die Entwicklung von Resistenzen. GCV stellt gewöhnlich das Medikament der ersten Wahl dar. Hauptnebenwirkung sind Neutropenien durch Knochenmarkstoxizität. Langzeittherapien führen durch Mutationen in viralen Genen zu Resistenzen <sup>29</sup>. FOS wird meist als Alternative verwendet, der Einsatz wird jedoch durch Nephrotoxizität und Elektrolytstörungen <sup>208</sup> limitiert, auch zeigen Langzeittherapien die Entwicklung von Resistenzen <sup>101</sup>.

Am effektivsten hat sich die 3-monatige intravenöse Therapie mit Ganciclovir erwiesen, die jedoch eine hospitalisierende und kostenaufwendige Applikation beinhaltet, so dass die Kombiantion einer 1-2-wöchigen intravenösen, gefolgt von einer 3-monatigen oralen Ganciclovir Einnahme praktiziert wird <sup>167</sup>. In einer Studie mit Herztransplantierten zeigte eine Ganciclovir Prophylaxe einen protektiven Effekt bei seropositiven Patienten, aber nicht bei Primärinfektion <sup>130</sup>. Eine prophylaktische Therapie ist bei der Prävention einer CMV Erkrankung bei seropositiven Herztransplantatempfängern wirksam und wird zunehmend routinemäßig bei Donor positiven und Rezeptor negativen Herzallograft Empfängern verwendet <sup>167</sup>. In vitro zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt von Ganciclovir auf SMC Proliferation. Die benötigte Konzentration war jedoch beträchtlich höher als die, die zur Hemmung der CMV Replikation verwendet wird <sup>113</sup>.

Eine Kombination von CMV Hyperimmunglobulin und Ganciclovir ist assoziiert mit einer reduzierten Inzidenz der Transplantatvaskulopathie, mit reduzierter intimaler Hypertrophie und verbesserter Überlebensrate <sup>203</sup>.

Zusammenfassend kann eine antivirale Prophylaxe in einigen Fällen sinnvoll sein, jedoch müssen das Risiko einer hohen Kosten-Strategie, das Exponieren der

Patienten mit der Medikamententoxizität und die Ausbildung von Resistenzen erwogen werden <sup>49</sup>.

Seit Anfang der 90er Jahre wird zunehmend die kostengünstigere präemptive Therapie durchgeführt. Präemptive Therapie beinhaltet eine Reduzierung der Inzidenz der hCMV Erkrankung durch eine Gabe von antiviralen Medikamenten bei einer Hochrisiko-Subpopulation, die entweder definiert ist durch ein bestimmtes klinisches Charakteristikum oder einen Labormarker <sup>167</sup>. Bei immunsuppressiver Therapie nach Herztransplantation bei seropositiven Patienten konnte präemptive GCV Therapie hCMV Erkrankungen signifikant reduzieren. Bei einer zusätzlichen oralen Ganciclovir Therapie über 3 Monate tritt nahezu keine CMV Erkrankung mehr auf <sup>88</sup>. Präemptive Therapie wird ebenfalls bei Virämie im PCR Monitoring durchgeführt <sup>34</sup>.

Der enorme volkswirtschaftliche Schaden entstanden durch die allein in Deutschland pro Jahr ca. 500 000 vorgenommenen Herzkatheteruntersuchungen und die entstehenden Restenosen, sowie deren Behandlung fordern dringend eine Lösung des Problems. Ein hoher Prozentsatz der betroffenen Bevölkerung ist hCMV positiv <sup>8</sup>. HCMV gilt als atherogener Risikofaktor <sup>136</sup>. Eine prophylaktische Therapie bedeutet einen hohen Kostenaufwand, gleichzeitig werden Patienten der Toxizität der Medikamente ausgesetzt und Resistenzen gezüchtet. Eine Kombination von CMV Hyperimmunglobulin und Ganciclovir konnte aber eine reduzierte Inzidenz der Transplantatvaskulopathie mit reduzierter intimaler Hypertrophie zeigen. Weiterhin wird einer verbesserte Überlebensrate beschrieben <sup>203</sup>. Die präemptive Therapie zeigte in der Transplantatmedizin gute Ergebnisse <sup>70 47 179</sup>. Effektive Impfstoffe werden beim Schutz von Risikogruppen eine entscheidende Rolle spielen.

## **5 Zusammenfassung**

Die koronare Restenose nach Katheterintervention stellt ein zentrales Problem in der interventionellen Kardiologie dar. In den letzten Jahren gewann eine Beteiligung infektiöser Erreger an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zunehmend an Bedeutung. Zahlreiche klinische und experimentelle Daten deuten auf eine potentielle pathophysiologische Rolle des humanen Cytomegalievirus und distinkter

Genregionen im Zusammenhang mit Zellhypertrophie und Proliferation als grundlegender Pathomechanismus der Restenose hin. Weiterhin verfügt das hCMV durch unterschiedliche zelluläre Interaktionen über ein ausgeprägtes atherogenes Potential.

Bislang gab es noch keine direkten Hinweise, ob hCMV bzw. das distinkte Genprodukt IE2 in ruhenden koronaren glatten Gefäßmuskelzellen eine Zellproliferation durch Induktion des Eintritts der Zellen in die S-Phase initiieren kann.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten Daten zur Proliferationsinduktion koronarer glatter Muskelzellen durch hCMV und dessen Immediate Early-Genprodukt IE2 akquiriert werden. HCMV und IE2 induzieren den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Mittels drei unabhängiger Assays, der Thymidininkorporation, der Durchflusszytometrie und des Western Blot (Nachweis der erhöhten Induktion des S-Phasen Markerproteins PCNA), zeigte sich gegenüber Kontrollen eine erhöhte DNA-Synthese in hCMV und Ad-IE2 infizierten Zellen. Eine Progression in die G<sub>1</sub>/S-Phase wird durch eine im Westernblot festgestellte erhöhte Expression des PCNA sowie durch durchflusszytometrische Ergebnisse mit einem erhöhten Anteil an Ad-IE2 infizierten Zellen in der S-Phase bestätigt.

Die Kinaseaktivität des für die Transition G<sub>1</sub>/S-Phase essentiellen Cyclin A/CDK2-Komplexes sowie erhöhte Proteinkonzentrationen des G<sub>1</sub>-Cyclins Cyclin D1 und CDK 4 deuten auf eine erhöhte Aktivität von Zellzyklusfaktoren hin, welche wichtig für die G<sub>1</sub>/S Transition sind. Mit der in dieser Arbeit gezeigten Interaktion zwischen dem IE2 und dem Cyclin D1/CDK 4 Komplex konnten transaktivierende Eigenschaften aufgedeckt werden, die einen Beitrag zur Klärung der Frage leisten, wie hCMV eine Hypertrophie und Proliferation CSMCs (co-) initiieren kann, welche konsekutiv zur potentiellen Ausbildung einer vaskulären Läsion führen kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass hCMV über multifaktorielle Wege einen Einfluss auf die Bildung einer Restenose ausübt (siehe Abb. 25). HCMV und sein Genprodukt IE2 induzieren den Eintritt ruhender humaner koronarer glatter Muskelzellen in die S-Phase des Zellzyklus und ermöglichen somit den Ausgangspunkt einer konsekutiven Zellhypertrophie und –proliferation.

Eine präemptive antivirale Behandlung könnte bei Risikopatienten in therapeutische Überlegungen mit einbezogen werden.

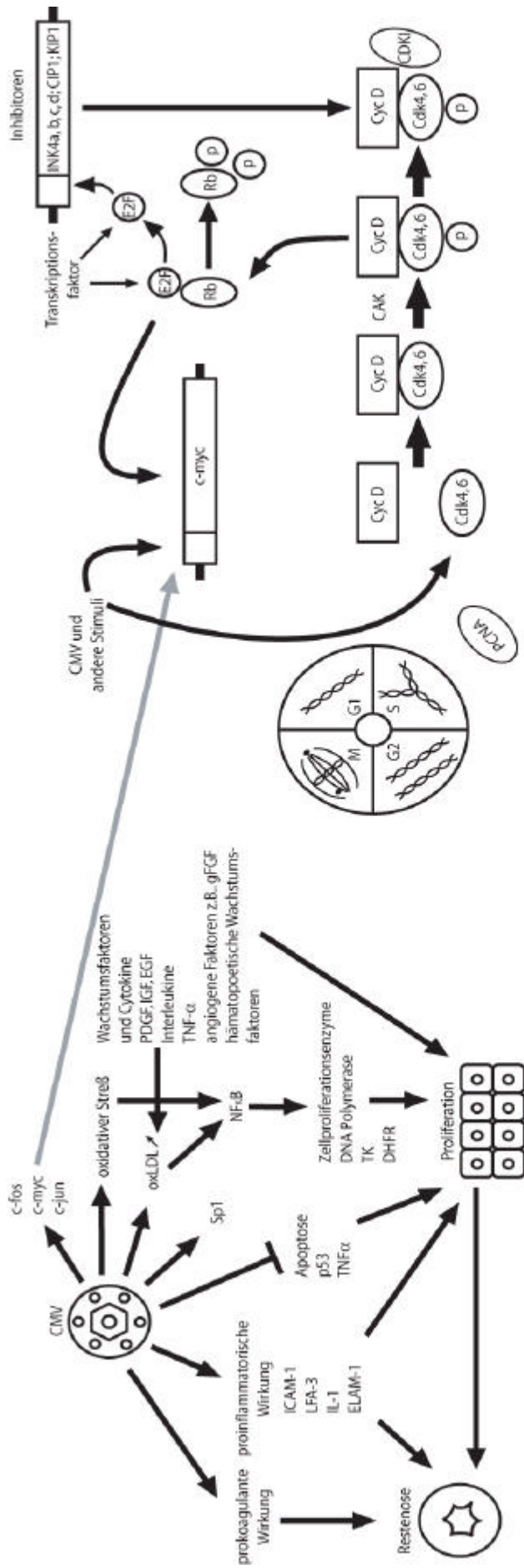


Abb. 26: Wirkung des CMV bei der koronaren Restenose (modifiziert nach Li, J.-M. und Brooks, G. Eur Heart J 1999)



## 6 Literaturverzeichnis

1. Adam E, Melnick JL, Probstfield JL, Petrie BL, Burek J, Bailey KR, et al. High levels of cytomegalovirus antibody in patients requiring vascular surgery for atherosclerosis. *Lancet* 1987; 2:291-293.
2. Addo MM, Rosenberg ES. Cellular immune responses in transplantation-associated chronic viral infections. *Transpl.Infect.Dis.* 2002; 4:31-40.
3. Adler SP, Hur JK, Wang JB, Vetrovec GW. Prior infection with cytomegalovirus is not a major risk factor for angiographically demonstrated coronary artery atherosclerosis. *J.Infect.Dis.* 1998; 177:209-212.
4. Ahn JH, Hayward GS. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J.Virol.* 1997; 71:4599-4613.
5. Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y, Früh K. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996; 93:10990-10995.
6. Albrecht T, Boldogh I, Fons M, Lee CH, AbuBakar S, Russell JM, et al. Cell-activation responses to cytomegalovirus infection relationship to the phasing of CMV replication and to the induction of cellular damage. *Subcell.Biochem.* 1989; 15:157-202.
7. Albrecht T, Nachtigal M, St JS, Rapp F. Induction of cellular DNA synthesis and increased mitotic activity in syrian hamster embryo cells abortively infected with human cytomegalovirus. *J.Gen.Virol.* 1976; 30:167-177.
8. Alford, C. A. and Britt W. J. *Cytomegalovirus.* 1990. New York, Raven Press,Ltd.  
Ref Type: Generic
9. Ananyeva NM, Tjurmin AV, Berliner JA, Chisolm GM, Liao G, Winkles JA, et al. Oxidized LDL mediates the release of fibroblast growth factor-1. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997; 17:445-453.
10. Auge N, Pieraggi MT, Thiers JC, Negre SA, Salvayre R. Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells. *Biochem.J.* 1995; 309:1015-1020.
11. Beijersbergen RL, Bernards R. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1996; 1287:103-120.
12. Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J.Clin.Invest.* 1995; 96:2521-2527.
13. Bertrand ME, Bauters C. Cytomegalovirus infection and coronary restenosis [editorial; comment]. *Circulation* 1999; 99:1278-1279.
14. Bjorkerud B, Bjorkerud S. Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle

- cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1996; 16:416-424.
15. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Espinola-Klein C, Rippin G, Hafner G, et al. Cytomegalovirus Infection with Interleukin-6 Response Predicts Cardiac Mortality in Patients with Coronary Artery Disease. *Circulation* 2001; 103:2915-2921.
  16. Blum A, Giladi M, Weinberg M, Kaplan G, Pasternack H, Laniado S, et al. High anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer is associated with coronary artery disease and may predict post-coronary balloon angioplasty restenosis. *Am.J.Cardiol.* 1998; 81:866-868.
  17. Boldogh I, AbuBakar S, Albrecht T. Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science* 1990; 247:561-564.
  18. Bonin LR, McDougall JK. Human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein binds p53 but does not abrogate G1 checkpoint function. *J.Virol.* 1997; 71:5861-5870.
  19. Bresnahan WA, Albrecht T, Thompson EA. The cyclin E promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kDa immediate early protein. *J.Biol.Chem.* 1998; 273:22075-22082.
  20. Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* 1996; 224:150-160.
  21. Brooks G, Poolman RA, Li JM. Arresting developments in the cardiac myocyte cell cycle: role of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cardiovasc.Res.* 1998; 39:301-311.
  22. Buffon A, Liuzzo G, Biasucci LM, Pasqualetti P, Ramazzotti V, Rebuffi AG, et al. Preprocedural serum levels of C-reactive protein predict early complications and late restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2002; 1999:1512-1521.
  23. Castillo JP, Yurochko AD, Kowalik TF. Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. *J.Virol.* 2000; 74:8028-8037.
  24. Caswell R, Hagemeyer C, Chiou CJ, Hayward G, Kouzarides T, Sinclair J. The human cytomegalovirus 86K immediate early (IE) 2 protein requires the basic region of the TATA-box binding protein (TBP) for binding, and interacts with TBP and transcription factor TFIIB via regions of IE2 required for transcriptional regulation. *J.Gen.Virol.* 1993; 74:2691-2698.
  25. Chatterjee S, Bhunia AK, Snowden A, Han H. Oxidized low density lipoproteins stimulate galactosyltransferase activity, ras activation, p44 mitogen activated protein kinase and c-fos expression in aortic smooth muscle cells. *Glycobiology.* 1997; 7:703-710.
  26. Chatterjee S, Ghosh N. Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycobiology.* 1996; 6:303-311.

27. Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; 58:1193-1198.
28. Cherrington JM, Mocarski ES. Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J.Virol.* 1989; 63:1435-1440.
29. Chou S, Marousek G, Grentzel S, Follansbee SE, Poscher ME, Lalezari JP. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J.Infect.Dis.* 1997; 176:786-789.
30. Cinatl J, Kotchetkov R, Scholz M, Vogel JU, Driever PH, Doerr HW. Human cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 independent of the tumor suppressor protein p53. *Am.J.Pathol.* 1999; 155:285-292.
31. Cinatl J, Vogel JU, Kotchetkov R, Scholz M, Doerr HW. Proinflammatory potential of cytomegalovirus infection. Specific inhibition of cytomegalovirus immediate-early expression in combination with antioxidants as a novel treatment strategy? *Intervirol.* 1999; 42:419-424.
32. Connell CL, Harper JW, Goodrich DW. Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol.Biol.Cell* 1997; 8:287-301.
33. Cote G, Tardif JC, Lesperance J, Lambert J, Bourassa M, Bonan R, et al. Effects of probucol on vascular remodeling after coronary angioplasty: Multivitamins and Protocol Study Group. *Circulation* 1999; 99:30-35.
34. Couchoud C, Cucherat M, Haugh M, Pouteil-Noble C. Cytomegalovirus prophylaxis with antiviral agents in solid organ transplantation. *Transplantation* 1998; 65:641-647.
35. Craigen JL, Grundy JE. Cytomegalovirus induced up-regulation of LFA-3 (CD58) and ICAM-1 (CD54) is a direct viral effect that is not prevented by ganciclovir or foscarnet treatment. *Transplantation* 1996a; 62:1102-1108.
36. Craigen JL, Grundy JE. Cytomegalovirus induced up-regulation of LFA-3 (CD58) and ICAM-1 (CD54) is a direct viral effect that is not prevented by ganciclovir or foscarnet treatment. *Transplantation* 1996b; 62:1102-1108.
37. Dangler CA, Baker SE, Kariuki NM, Chia SH. Murine cytomegalovirus-associated arteritis. *Vet.Pathol.* 1995; 32:127-133.
38. Darius-H. Thrombozyteninteraktionen mit der Gefäßwand und ihre Bedeutung für die Restenose. *Zeitschrift für Kardiologie* 1997; Band 86:137 Abstract.
39. Dartsch PC, Voisard R, Bauriedel G, Hofling B, Betz E. Growth characteristics and cytoskeletal organization of cultured smooth muscle cells from human primary stenosing and restenosing lesions. *Arteriosclerosis* 1990; 10:62-75.
40. de Beer FC, Hind CR, Fox KM. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischemia and infarction. *Br Heart J* 1982; 47:239-243.

41. DeCaprio JA, Furukawa Y, Ajchenbaum F, Griffin JD, Livingston DM. The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992; 89:1795-1798.
42. DeMarchi JM. Correlation between stimulation of host cell DNA synthesis by human cytomegalovirus and lack of expression of a subset of early virus genes. *Virology* 1983; 129:274-286.
43. Dengler TJ, Raftery MJ, Werle M, Zimmermann R, Schonrich G. Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1beta. *Transplantation* 2000; 69:1160-1168.
44. Dittmer D, Mocarski ES. Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J.Virol.* 1997; 71:1629-1634.
45. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, et al. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994; 76:1013-1023.
46. Dummer S, Lee A, Breinig MK, Kormos R, Ho M, Griffith B. Investigation of cytomegalovirus infection as a risk factor for coronary atherosclerosis in the explanted hearts of patients undergoing heart transplantation. *J.Med.Virol.* 1994; 44:305-309.
47. Einsele H, Ehninger G, Hebart H, Wittkowski KM, Schuler U, Jahn G, et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86:2815-2820.
48. El DW, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75:817-825.
49. Emery VC. Prophylaxis for CMV should not replace pre-emptive therapy in solid organ transplantation. *Rev Med Virol* 2001; 11:83-86.
50. Epstein SE, Speir E, Unger EF, Guzman R, Finkel T. The basis of molecular strategies for treating coronary restenosis after angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1278-1288.
51. Epstein SE, Speir E, Zhou YF, Guetta E, Leon M, Finkel T. The role of infection in restenosis and atherosclerosis: focus on cytomegalovirus. *Lancet* 1996; 348 Suppl 1:http-1115/Ohne
52. Etingin OR, Silverstein RL, Friedman HM, Hajjar DP. Viral activation of the coagulation cascade: molecular interactions at the surface of infected endothelial cells. *Cell* 1990; 61:657-662.
53. Etingin OR, Silverstein RL, Hajjar DP. Identification of a monocyte receptor on herpesvirus-infected endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1991; 88:7200-7203.

54. Etingin OR, Silverstein RL, Hajjar DP. von Willebrand factor mediates platelet adhesion to virally infected endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1993; 90:5153-5156.
55. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR. Virus-induced atherosclerosis. *The Journal of Experimental Medicine* 1978; 335-340.
56. Fabricant CG, Fabricant J, Minick CR, Litrenta MM. Herpesvirus-induced atherosclerosis in chickens. *Fed.Proc.* 1983; 42:2476-2479.
57. Falagas ME, Paya C, Ruthazer R, Badley A, Patel R, Wiesner R, et al. Significance of cytomegalovirus for long-term survival after orthotopic liver transplantation: a prospective derivation and validation cohort analysis. *Transplantation* 1998; 66:1020-1028.
58. Falagas ME, Snyderman DR, Griffith J, Ruthazer R, Werner BG. Effect of cytomegalovirus infection status on first year mortality rates among orthotopic liver transplant recipients. *Ann.Intern.Med.* 1997; 126:275-279.
59. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, et al. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 1999; 99:44-52.
60. Farmer JA, Gotto-AM J. Dyslipidemia and other risk factors for coronary artery disease. In: Braunwald E, editor. *Heart Disease: A Text Book of Cardiovascular Medicine*. 5th ed. Philadelphia: Saunders,W.B., 1997:1126-1160.
61. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253:1129-1132.
62. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N.Engl.J.Med.* 1994; 331:496-501.
63. Forstermann U, Mugge A, Alheid U, Haverich A, Frolich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ.Res.* 1988; 62:185-190.
64. Fortunato EA, Spector DH. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv.Virus.Res* 1999; 54:61-128.
65. Furukawa T, Sakuma S, Plotkin SA. Human cytomegalovirus infection of WI-38 cells stimulates mitochondrial DNA synthesis. *Nature* 1976; 262:414-416.
66. Furukawa T, Tanaka S, Plotkin SA. Stimulation of macromolecular synthesis in guinea pig cells by human CMV. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1975; 148:211-214.
67. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21-negative regulator of the cell cycle. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1996; 213:138-149.
68. Gebert S, Schmolke S, Sorg G, Floss S, Plachter B, Stamminger T. The UL84 protein of human cytomegalovirus acts as a transdominant inhibitor of

- immediate-early-mediated transactivation that is able to prevent viral replication. *J.Virol.* 1997; 71:7048-7060.
69. Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing of its immediate-early gene product. *Nature* 2003; 384:720-722.
  70. Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA, Du Mond C, Cays M, Ebeling DF, et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *N.Engl.J.Med.* 1991; 325:1601-1607.
  71. Grattan MT, Moreno CC, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* 1989; 261:3561-3566.
  72. Greenberg PD, Riddell SR. Deficient cellular immunity finding and fixing the defects. *Science* 1999; 285:546-551.
  73. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller K-M. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol* 1999; 35:157-163.
  74. Gribaudo G, Ravaglia S, Guandalini L, Cavallo R, Gariglio M, Landolfo S. The murine cytomegalovirus immediate-early 1 protein stimulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 promoter. *Virus Res.* 1996; 45:15-27.
  75. Grundy JE, Downes KL. Up-regulation of LFA-3 and ICAM-1 on the surface of fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Immunology* 1993; 78:405-412.
  76. Grundy JE, Lawson KM, MacCormac LP, Fletcher JM, Yong KL. Cytomegalovirus-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C chemokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration. *J.Infect.Dis.* 1998; 177:1465-1474.
  77. Gu Y, Turck CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993; 366:707-710.
  78. Guetta E, Guetta V, Shibutani T, Epstein SE. Monocytes harboring cytomegalovirus: interactions with endothelial cells, smooth muscle cells, and oxidized low-density lipoprotein. Possible mechanisms for activating virus delivered by monocytes to sites of vascular injury. *Circ.Res.* 1997; 81:8-16.
  79. Hagemeyer C, Caswell R, Hayhurst G, Sinclair J, Kouzarides T. Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein. *EMBO J.* 1994; 13:2897-2903.
  80. Hagemeyer C, Walker S, Caswell R, Kouzarides T, Sinclair J. The human cytomegalovirus 80-kilodalton but not the 72-kilodalton immediate-early protein transactivates heterologous promoters in a TATA box-dependent mechanism and interacts directly with TFIID. *J.Virol.* 1992; 66:4452-4456.
  81. Hagemeyer C, Walker SM, Sissons PJ, Sinclair JH. The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-

- myc and hsp70 promoters via basal promoter elements. *J.Gen.Virol.* 1992; 73:2385-2393.
82. Hajjar DP, Pomerantz KB, Falcone DJ, Weksler BB, Grant AJ. Herpes simplex virus infection in human arterial cells. Implications in atherosclerosis. *J.Clin.Invest.* 1987; 80:1317-1321.
  83. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75:805-816.
  84. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SDM. for the European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet* 1997; 349:462-466.
  85. Hayhurst GP, Bryant LA, Caswell RC, Walker SM, Sinclair JH. CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein. *J.Virol.* 1995; 69:182-188.
  86. Hendrix MG, Salimans MM, van BC, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am.J.Pathol.* 1990; 136:23-28.
  87. Herold G. *Innere Medizin.* 2000.
  88. Hibbert PL, Tolkoff-Rubin NE, Conti D. Preemptive ganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease in cytomegalovirus anti-body positive renal transplant recipients. *Ann.Intern.Med.* 1995; 123:18-26.
  89. Hinzpeter B, Klever-Deichert G, Wendland G, Lauterbach K. Die koronare Herzkrankheit und die Sozialversicherung. *Herz.* 2000; 5:515-525.
  90. Ho, M. *Cytomegalovirus: biology and infection.* 1991. N. Y., Plenum Publishing Corp., New York. (GENERIC)  
Ref Type: Generic
  91. Hoffmann R, Mintz GS, Dussailant RG. Pattern and mechanisms of in-stent restenosis: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; 94:1247-1254.
  92. Inaba T, Gotoda T, Shimano H, Shimada M, Harada K, Kozaki K, et al. Platelet-derived growth factor induces c-fms and scavenger receptor genes in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 1992; 267:13107-13112.
  93. Jault FM, Jault JM, Ruchti F, Fortunato EA, Clark C, Corbeil J, et al. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J.Virol.* 1995; 69:6697-6704.
  94. Ji L, Arcinas M, Boxer LM. NF-kappa B sites function as positive regulators of expression of the translocated c-myc allele in Burkitt's lymphoma. *Mol.Cell Biol.* 1994; 14:7967-7974.

95. Jones TR, Hanson LK, Sun JS, Slater JS, Stenberg RM, Campbell AE. Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol.* 1995; 69:4830-4841.
96. Jones TR, Wiertz E, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of MHC Class I heavy chains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996; 93:11327-11333.
97. Jupp R, Hoffmann S, Stenberg RM, Nelson JA, Ghazal P. Human cytomegalovirus IE86 protein interacts with promoter-bound TATA-binding protein via a specific region distinct from the autorepression domain. *J.Virol.* 1993; 67:7539-7546.
98. Kapasi K, Rice GP. Cytomegalovirus infection of peripheral blood mononuclear cells.Effects on interleukin-1 and 2 production and responsiveness. *J Virol.* 1988; 62:3603-3607.
99. Kearney M, Pieczek A, Haley L, Losordo DW, Andres V, Schainfeld R, et al. Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 1997; 95:1998-2002.
100. Key NS, Vercellotti GM, Winkelmann JC, Moldow CF, Goodman JL, Esmon NL, et al. Infection of vascular endothelial cells with herpes simplex virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1990; 87:7095-7099.
101. Knox KK, Drobyski WR, Carrigan DR. Cytomegalovirus isolate resistant to ganciclovir and foscarnet from a marrow transplant patient. *Lancet* 1991; 2:1292-1293.
102. Kocher AA, Bonaros N, Dunkler D, Ehrlich M, Schlechta B, Zweytick B, et al. Long-term results of CMV hyperimmune globulin prophylaxis in 377 heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2003; 22:250-257.
103. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans. Macroscopic, histological and immunohistochemical analysis. *Circulation* 1998; 98:224-233.
104. Kornowsky R, Hong MK, Fermin OT, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointima hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:224-230.
105. Koskinen PK, Kallio EA, Tikkanen JM, Sihvola RK, Häyry PJ, Lemström KB. Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transpl.Infect.Dis.* 1998; 1:115-126.
106. Koskinen PK, Nieminen MS, Krogerus LA, Lemstrom KB, Mattila SP, Hayry PJ, et al. Cytomegalovirus infection accelerates cardiac allograft vasculopathy: correlation between angiographic and endomyocardial biopsy findings in heart transplant patients. *Transpl.Int.* 1993a; 6:341-347.
107. Koskinen PK, Nieminen MS, Krogerus LA, Lemstrom KB, Mattila SP, Hayry PJ, et al. Cytomegalovirus infection and accelerated cardiac allograft



- vasculopathy in human cardiac allografts. *J.Heart Lung Transplant.* 1993b; 12:724-729.
108. Kowalik TF, Wing B, Haskill JS, Azizkhan JC, Baldwin AS J, Huang ES. Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-kappa B activity during human cytomegalovirus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1993; 90:1107-1111.
  109. Kusunoha M, Chait A, Cader A, Berk BC. Oxidized LDL stimulates mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997; 17:141-148.
  110. La RF, Pierce JW, Sonenshein GE. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappa B rel family of transcription factors. *Mol.Cell Biol.* 1994; 14:1039-1044.
  111. Lang D, Gebert S, Arlt H, Stamminger T. Functional interaction between the human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein and the cellular transcription factor CREB. *J.Virol.* 1995; 69:6030-6037.
  112. Lemstrom K, Koskinen P, Krogerus L, Daemen M, Bruggeman C, Hayry P. Cytomegalovirus antigen expression, endothelial cell proliferation, and intimal thickening in rat cardiac allografts after cytomegalovirus infection. *Circulation* 1995; 92:2594-2604.
  113. Lemstrom K, Sihvola R, Bruggeman C, Hayry P, Koskinen P. Cytomegalovirus infection-enhanced cardiac allograft vasculopathy is abolished by DHPG prophylaxis in the rat. *Circulation* 1997; 95:2614-2616.
  114. Li JM, Brooks G. Cell cycle regulatory molecules (cyclins, cyclin-dependent kinases and cyclin-dependent kinase inhibitors) and the cardiovascular system. Potential targets for therapy? *Eur.Heart J.* 1999; 20:406-420.
  115. Li R, Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 1994; 371:534-537.
  116. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N.Engl.J.Med.* 1994; 331:417-424.
  117. Löffler G, Petrides PE. *Biochemie and Pathobiochemie.* 5 ed. 1997.
  118. Lu M, Shenk T. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J.Virol.* 1996; 70:8850-8857.
  119. Lukac DM, Alwine JC. Effects of human cytomegalovirus major immediate-early proteins in controlling the cell cycle and inhibiting apoptosis: studies with ts13 cells. *J.Virol.* 1999; 73:2825-2831.
  120. Lukac DM, Manuppello JR, Alwine JC. Transcriptional activation by the human cytomegalovirus immediate-early proteins: requirements for simple promoter structures and interactions with multiple components of the transcription complex. *J.Virol.* 1994; 68:5184-5193.

121. Mach F. Toward new therapeutic strategies against neointimal formation in restenosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000; 20:1699-1700.
122. Marshall JJ, Wu KX, Peterson TE, Treasure CB, Harrison DG. Superoxide anions, produced by regenerated endothelium, contribute to impaired endothelium-dependent relaxations following balloon injury. *Circulation* 1993; 88(suppl I):467 Abstract.
123. Martinez AM, Afshar M, Martin F, Cavadore JC, Labbe JC, Doree M. Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *EMBO J.* 1997; 16:343-354.
124. Maziere C, Auclair M, Djavaheri MM, Packer L, Maziere JC. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 1996; 39:1201-1207.
125. Maziere C, Djavaheri MM, Frey FV, Delattre J, Maziere JC. Copper and cell-oxidized low-density lipoprotein induces activator protein 1 in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1997; 409:351-356.
126. McEvan-J. Potential for antiviral therapie in the treatment of restenosis after angioplastie. *Br Heart J* 1995; 73:489
127. Melnick JL, Adam E, Debakey ME. Cytomegalovirus and atherosclerosis. *Eur.Heart J.* 1993; 14 Suppl K:http-Dokument
128. Melnick JL, Ervin A, Michael ED. Possible role of cytomegalovirus in atherogenesis. *JAMA* 1990; 263:2204-2207.
129. Melnick JL, Hu C, Burek J, Adam E, Debakey ME. Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *J.Med.Virol.* 1994; 42:170-174.
130. Merigan TC, Renlund DG, Keay S, Bristow MR, Starnes V, O'Connell JB, et al. A controlled trial of gancicbvir to prevent cytomegalovirus disease after heart transplantation. *N.Engl.J.Med.* 1992; 326:1182-1186.
131. Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, et al. Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996; 94:35-43.
132. Mocarski ES. Immunmodulation by cytomegalovirus: manipulative strategies beyond evasion. *Trends.Microbiol.* 2002; 10:332-339.
133. Monick MM, Geist LJ, Stinski MF, Hunninghake GW. The immediate early genes of human cytomegalovirus upregulate expression of the cellular genes *myc* and *fos*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1992; 7:251-256.
134. Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT. Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue. *Am.J.Cardiol.* 1999; 84:462-466.
135. Mudra H, Regar E, Klauss V. Serial follow up after optimized ultrasound guided developement of Palmaz-Schatz stents. *Circulation* 1997; 95:363-370.

136. Muhlestein-JB M, Horne-BD M, Carlquist-JF P. Cytomegalovirus seropositivity and C-reactive protein have independent and combined predictive value for mortality in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102:1917-1923.
137. Murphy EA, Streblow DN, Nelson JA, Stinski MF. The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S-Phase of permissive cells. *J.Virol.* 2000; 74:7108-7118.
138. Natarajan V, Scribner WM, Hart CM, Parthasarathy S. Oxidized low density lipoprotein-mediated activation of phospholipase D in smooth muscle cells: a possible role in cell proliferation and atherogenesis. *J.Lipid Res.* 1995; 36:2005-2016.
139. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:819-824.
140. Nevins JR. Disruption of cell-cycle control by viral oncoproteins. *Biochem.Soc.Trans.* 1993; 21:935-938.
141. Newby AC, George SJ. Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies. *Cardiovasc.Res.* 1993; 27:1173-1183.
142. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 1995; 17:471-480.
143. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla HS, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, et al. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989; 86:1372-1376.
144. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu.Rev.Immunol.* 1998; 16:323-358.
145. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989; 246:603-608.
146. Pass RF, Stango S, Britt WJ. Specific cell-mediated immunity and natural history of congenital infection with cytomegalovirus. *J.Infect.Dis.* 1983; 148:953-961.
147. Pepperl S, Münster J, Mach M, Harris R, Plachter B. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol.* 2000; 74:6132-6146.
148. Persoons MC, Daemen MJ, Bruning JH, Bruggeman CA. Active cytomegalovirus infection of arterial smooth muscle cells in immunocompromised rats. A clue to herpesvirus-associated atherogenesis? *Circ.Res.* 1994; 75:214-220.
149. Pietila K, Marmoinen A, Hermens W. C-reactive protein concentration in myocardial infarct patients with a closed versus an open infarct related coronary artery after thrombolytic therapy. *Eur.Heart J.* 1993; 14:915-919.

150. Pines J. Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv.Cancer Res.* 1995; 66:http-1100/Z
151. Pines J. Cyclin-dependent kinase inhibitors: the age of crystals. *Biochim.Biophys.Acta* 1997; 1332:M39-M42
152. Plotkin SA. Vaccination against cytomegalovirus, the changeling demon. *Pediatr.Infect.Dis.* 1999; 18:313-325.
153. Poma EE, Kowalik TF, Zhu L, Sinclair JH, Huang ES. The human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with the cellular p107 protein and relieves p107-mediated transcriptional repression of an E2F-responsive promoter. *J.Virol.* 1996; 70:7867-7877.
154. Pryzdial EL, Wright JF. Prothrombinase assembly on an enveloped virus: evidence that the cytomegalovirus surface contains procoagulant phospholipid. *Blood* 1994; 84:3749-3757.
155. Reddehase MJ, Balthesen M, Rapp M, Jonjic S, Pavic I, Koszinovski UH. The conditions of primary infection define the load of latent viral genome in organs and the risk of recurrent cytomegalovirus disease. *J.Exp.Med.* 1994; 179:185-193.
156. Reddehase MJ, Mutter W, Münch K, Buhring JH, Koszinowski UH. CD8-positive T Lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol.* 1987; 61:3102-3108.
157. Reimer K, Meisel H. humanes Zytomegalievirus. In: Porstman T, editor. *Virusdiagnostik.* 1 ed. Blackwell, 1996:258-264.
158. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N.Engl.J.Med.* 1996; 336:973-979.
159. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA. for the Cholesterol and recurrent Events (CARE) Investigators. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation* 1998; 98:839-844.
160. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986; 83:4167-4171.
161. Rogers C, Edelman ER, Simon DI. A mAb to the beta 2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD 18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998; 95:10134-10139.
162. Rogers C, Welt FG, Karnovsky MJ, Edelmann ER. Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits:coupled inhibitory effects of heparin. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1996; 1996:1312-1318.
163. Rolland PH, Jouve R, Pellegrin E, Mercier C, Serradimigni A. Alteration in prostacyclin and prostaglandin E2 production. Correlation with changes in human aortic atherosclerotic disease. *Arteriosclerosis* 1984; 4:70-78.

164. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* 1993; 7:1208-1218.
165. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
166. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease [see comments]. *N.Engl.J.Med.* 1999; 340:115-126.
167. Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus disease in heart transplant patients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2000; 19:731-735.
168. Sambucetti LC, Cherrington JM, Wilkinson GW, Mocarski ES. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J.* 1989; 8:4251-4258.
169. Scholz M, Blaheta RA, Cinatl J, Encke A, Doerr HW, Markus BH. Lymphocytes induce enhanced expression of HLA class I antigens on cytomegalovirus-infected syngeneic human endothelial cells. *Hum.Immunol.* 1995; 44:136-144.
170. Scholz M, Doerr HW, Cinatl J. Inhibition of cytomegalovirus immediate early gene expression: a therapeutic option? *Antiviral Research* 2001; 49:129-145.
171. Scholz M, Hamann A, Blaheta RA, Auth MK, Encke A, Markus BH. Cytomegalovirus- and interferon-related effects on human endothelial cells. Cytomegalovirus infection reduces upregulation of HLA class II antigen expression after treatment with interferon-gamma. *Hum.Immunol.* 1992; 35:230-238.
172. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 2002; 1992:267-274.
173. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ.Res.* 1995; 77:445-465.
174. Scully AL, Sommer MH, Schwartz R, Spector DH. The human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein interacts with an early gene promoter via site-specific DNA binding and protein-protein associations. *J.Virol.* 1995; 69:6533-6540.
175. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F. A comparison of balloon-expandable stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N.Engl.J.Med.* 1994; 331:489-495.
176. Shibutani T, Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Moss J, Epstein SE. Pertussis toxin-sensitive G proteins as mediators of the signal transduction pathways activated by cytomegalovirus infection of smooth muscle cells. *J.Clin.Invest.* 1997; 100:2054-2061.
177. Sia JG, Patel R. New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clin.Microbiol.Rev.* 2000; 13:83-121.

178. Simon DI, Chen Z, Seifert P, Edelman ER, Ballantyne CM, Rogers C. Markedly reduced neointimal thickening in Mac-1 (CD11b/CD18)-deficient mice after carotid artery dilation and endothelial denudation. *Circulation* 1998; 98:238 Abstract.
179. Singh N, Yu VL, Miele L, Wagener MM, Miner RC, Gayowski T. High-dose acyclovir compared with short-course preemptive ganciclovir therapy to prevent cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. A randomized trial. *Ann.Intern.Med.* 1994; 120:375-381.
180. Skowronski EW, Mendoza A, Smith-SC J, Jaski BE. Detection of cytomegalovirus in paraffin-embedded postmortem coronary artery specimens of heart transplant recipients by the polymerase chain reaction: implications of cytomegalovirus association with graft atherosclerosis. *J.Heart Lung Transplant.* 1993; 12:717-723.
181. Smyth RL, Scott JP, Borysiewicz LK, Sharples LD, Stewart S, Wreghitt TG, et al. Cytomegalovirus infection in heart-lung transplant recipients: risk factors, clinical associations, and response to treatment. *J.Infect.Dis.* 1991; 164:1045-1050.
182. Sommer MH, Scully AL, Spector DH. Transactivation by the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein requires a domain that binds to both the TATA box-binding protein and the retinoblastoma protein. *J.Virol.* 1994; 68:6223-6231.
183. Span AH, Mullers W, Miltenburg AM, Bruggeman CA. Cytomegalovirus induced PMN adherence in relation to an ELAM-1 antigen present on infected endothelial cell monolayers. *Immunology* 1991; 72:355-360.
184. Span AH, van-Dam MM, Mullers W, Endert J, Muller AD, Bruggeman CA. The effect of virus infection on the adherence of leukocytes or platelets to endothelial cells. *Eur.J.Clin.Invest.* 1991; 21:331-338.
185. Speir E, Huang ES, Modali R, Leon MB, Shawl F, Finkel T, et al. Interaction of human cytomegalovirus with p53: possible role in coronary restenosis. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl.* 1995; 99:http-:http-
186. Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, et al. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 1994; 265:391-394.
187. Speir E, Shibutani T, Yu ZX, Ferrans V, Epstein SE. Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral infection. *Circ.Res.* 1996; 79:1143-1152.
188. St JS, Albrecht T, Funk F, Rapp F. Stimulation of cellular DNA synthesis by human cytomegalovirus. *J.Virol.* 1974; 13:353-362.
189. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N.Engl.J.Med.* 1989; 320:915-924.

190. Stenberg RM. Immediate-Early Genes of Human Cytomegalovirus: Organisation and Function. In: Becker Y, Darai G, editors. *Molecular Aspects of Human Cytomegalovirus Diseases*. Springer-Verlag, 1993:331-359.
191. Stenberg RM, Kerry JA. Cytomegalovirus Genes: Their Structure and Function. *Scand.J.Infect.Dis.Suppl.* 1995; 99:3-5.
192. Stiko RA, Hultgardh NA, Regnstrom J, Hamsten A, Nilsson J. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler.Thromb.* 1992; 12:1099-1109.
193. Tanaka S, Furukawa T, Plotkin SA. Human cytomegalovirus stimulates host cell RNA synthesis. *J.Virol.* 1975; 15:297-304.
194. Tannoch VJ, Hinds PW, Tsai LH. Cell cycle control. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2000; 465:127-140.
195. Taylor-Wiedemann J, Sissons JP, Sinclair JH. Induction of endogenous cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J.Virol.* 1994; 68:1597-1604.
196. Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM. Hemostatic factors in the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N.Engl.J.Med.* 1995; 332:635-641.
197. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 1990; 10:966-990.
198. Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, Gadola S, et al. Surface expression of HLA E an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 2000; 287:1031-1033.
199. Topol EJ. Coronary -artery stents: gauging, gorging and gouging. *N.Engl.J.Med.* 1998; 339:1702-1704.
200. Tsai HL, Kou GH, Chen SC, Wu CW, Lin YS. Human cytomegalovirus immediate-early protein IE2 tethers a transcriptional repression domain to p53. *J.Biol.Chem.* 1996; 271:3534-3540.
201. Tuszynski GP, Nicosia RF. The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. *Bioessays* 1996; 18:71-76.
202. Tyson JJ, Novak B, Odell GM, Chen K, Thron CD. Chemical kinetic theory: understanding cell-cycle regulation. *Trends.Biochem.Sci.* 1996; 21:89-96.
203. Valantine HA, Luikart H, Doyle RI, Thiers JC. CMVIG favorably affects long-term outcome after heart, heart-lung and lung transplantation. 19th Annual Meeting and Scientific Session. San Francisco, CA. Society for Heart and Lung Transplantation 1999; #193: Abstract.
204. van-Dam MM, Bruggeman CA, Muller AD, Debie WH, Zwaal RF. Induction of endothelial cell procoagulant activity by cytomegalovirus infection. *Thromb.Res.* 1987; 47:69-75.

205. van-Dam MM, Muller AD, van HV, Mullers WJ, Bomans PH, Bruggeman CA. The procoagulant response of cytomegalovirus infected endothelial cells. *Thromb.Haemost.* 1992; 68:364-370.
206. Virmani R, Farb A. Pathology of in-stent restenosis. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10:499-506.
207. Visser MR, Tracy PB, Vercellotti GM, Goodman JL, White JG, Jacob HS. Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988; 85:8227-8230.
208. Vogel JU, Scholz M, Cinatl J. Treatment of CMV diseases. *Intervirol* 1998; 40:357-367.
209. Wade M, Kowalik TF, Mudryj M, Huang ES, Azizkhan JC. E2F mediates dihydrofolate reductase promoter activation and multiprotein complex formation in human cytomegalovirus infection. *Mol.Cell Biol.* 1992; 12:4364-4374.
210. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N.Engl.J.Med.* 1995; 333:1038-1044.
211. Weck KE, Dal CA, Gould JD, O'Guin AK, Roth KA, Saffitz JE, et al. Murine gamma-herpesvirus 68 causes severe large-vessel arteritis in mice lacking interferon-gamma responsiveness: a new model for virus-induced vascular disease. *Nat.Med.* 1997; 3:1346-1353.
212. Weinberg RA. The retinoblastoma gene and cell growth control. *Trends.Biochem.Sci.* 1990; 15:199-202.
213. Weinberg RA. E2F and cell proliferation: a world turned upside down. *Cell* 1996; 85:457-459.
214. Wiebusch L, Hagemeyer C. Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G(1). *J.Virol.* 1999; 73:9274-9283.
215. Wiertz E, Hill A, Tortorella D, Ploegh H. Cytomegaloviruses use multiple mechanisms to elude the host immune response. *Immunology Letters* 1997; 57:213-216.
216. Wiertz E, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, et al. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 1996; 384:432-438.
217. Wilcox JN. Molecular biology: insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention. *Am.J.Cardiol.* 1993; 72:88E-95E.
218. Wittes JT, Kelly A, Plante KM. Meta-analysis of CMVIG studies for the prevention and treatment of CMV infection in transplant patients. *Transplant.Proc.* 1996; 28:17-24.



219. Wu TC, Hruban RH, Ambinder RF, Pizzorno M, Cameron DE, Baumgartner WA, et al. Demonstration of cytomegalovirus nucleic acids in the coronary arteries of transplanted hearts. *Am.J.Pathol.* 1992; 140:739-747.
220. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature* 1993; 366:701-704.
221. Yamanishi K, Rapp F. Induction of host DNA synthesis and DNA polymerase by DNA-negative temperature-sensitive mutants of human cytomegalovirus. *Virology* 1979; 94:237-241.
222. Yeager AS, Grumet FC, Hafleigh EB, Arvin AM, Bradley JS, Prober CG. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in newborn infants. *J.Pediatr.* 1981; 98:281-287.
223. Yokoi H, Daida H, Kuwabara Y, Nishikawa H, Takatsu F, Tomihara H, et al. Effectiveness of an antioxidant in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the ProbucoL Angioplasty Restenosis Trial. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:855-862.
224. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Komori K, Hirai K, Sugimachi K, Sueishi K. The immediate early gene of human cytomegalovirus stimulates vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1997; 231:447-451.
225. Yurochko AD, Hwang ES, Rasmussen L, Keay S, Pereira L, Huang ES. The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection. *J.Virol.* 1997; 71:5051-5059.
226. Yurochko AD, Kowalik TF, Huong SM, Huang ES. Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J.Virol.* 1995; 69:5391-5400.
227. Yurochko AD, Mayo MW, Poma EE, Baldwin-AS J, Huang ES. Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J.Virol.* 1997; 71:4638-4648.
228. Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, Griffiths PD, Pass RF. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J.Infect.Dis.* 1999; 180:702-707.
229. Zettler ME, Pierce GN. Cell cycle proteins and atherosclerosis. *Herz.* 2000; 25:100-107.
230. Zhou YF, Guetta E, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE. Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *J.Clin.Invest.* 1996; 98:2129-2138.
231. Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, Popma JJ, Yu ZX, Finkel T, et al. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N.Engl.J.Med.* 1996; 335:624-630.

232. Zhou YF, Shou M, Guetta E, Guzman R, Unger EF, Yu ZX, et al. Cytomegalovirus infection of rats increases the neointimal response to vascular injury without consistent evidence of direct infection of the vascular wall. *Circulation* 1999; 100:1569-1575.
233. Zhou YF, Yu ZX, Wanishsawad C, Shou M, Epstein SE. The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1999; 256:608-613.
234. Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J.Virol.* 1995; 69:7960-7970.
235. Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Epstein SE. Cytomegalovirus in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *JAAC* 1999; 34:1738-1743.
236. Zhu J, Quyyumi AA, Norman JE, Csako G, Waclawiw MA, Shearer GM, et al. Effects of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *Am.J.Cardiol.* 2000; 85:140-146.
237. Zhu L, Enders G, Lees JA, Beijersbergen RL, Bernards R, Harlow E. The pRB-related protein p107 contains two growth suppression domains: independent interactions with E2F and cyclin/cdk complexes. *EMBO J.* 1995; 14:1904-1913.
238. Zhu L, van-den HS, Helin K, Fattaey A, Ewen M, Livingston D, et al. Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 1993; 7:1111-1125.
239. Zinkernagel RM, Altiage A. Antiviral protection by virus-immune cytotoxic T cells: infected target cells are lysed before infectious virus progeny is assembled. *J.Exp.Med.* 1977; 145:644-651.
240. zur Hausen H. Viruses in human tumors-reminders and perspectives. *Adv.Cancer Res.* 1996; 68:1-22.

## 7 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
Ad-IE1	IE1 kodierender, adenoviraler Vektor
Ad-IE2	IE2 kodierender, adenoviraler Vektor
Ad-lacZ	LacZ kodierender, adenoviraler Vektor
ADP	Adenosin-diphosphat
Ak	Antikörper
Anti-PCNA-IgM	Anti-proliferating cell nuclear antigen-IgM
Anti-BrdU-POD	Peroxidase konjugierter BrdU-Antikörper
AP 1	activator protein 1
AS	Aminosäuren
b-FGF	basic fibroblast growth factor
βGal	Beta-Galactosidase
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CASMC	koronare glatte Muskelzelle
CDK	Cyclinabhängige Kinase
CKI	Cyclinabhängiger Kinaseninhibitor
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
CPLA <sub>2</sub>	cytosolic Phospholipase A <sub>2</sub>
CRP	C-reaktives Protein
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolat Reduktase
DHPG	9-(1,3-Dihydroxy-2-Propoxymethyl) Guanin; Ganciclovir
DMEM	Dulbecos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
ECGF	endothelial cell growth factor
Ecs	endothelial cell ( Endothelzelle)

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ELAM-1	endotheliales Leukozyten-Adäsionsmolekül 1
ETOH	Ethanol
E2F	E2-Faktor
FACS	Flureszenze activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2	Gap 2
G-CSF	granolocyte-colony-stimulating factor
GM-CSF	granolocyte macrophage-colony-stimulating factor
h	human
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	N2-Hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethylsulfonsäure
HBSS	Hanks salt solution
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leucocyte Antigen
HSV1	Herpes simplex Virus Typ1
HSV2	Herpes simplex Virus Typ2
ICAM-1	intracelluläres Adhäsionsmolekül 1
IE1	immediate early 1
IE2	immediate early 2
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Typ 1
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
ISR	In-Stent-Restenose
Kb	kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KHK	koronare Herzkrankheit
LacZ	Laktamase Z
LB	Luria-Bertani Medium
LDL	low density lipoprotein

LFA-3	Lymphozyten-funktions-assoziertes Molekül-3
LSP	Large scale prep
M	Mitose
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCMV	mouse Cytomegalievirus
MDV	Marek's disease virus
MIEP	major immediate early promoter
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Millimolar
MOI	multiplicity of infection
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxyd)
MRNA	messenger Ribonukleinsäure (-acid)
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NF-κB	nuclear factor -κB
NK	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffoxid
NTE	Natrium Tris EDTA
Ox LDL	oxidiertes low density lipoprotein
P21	Protein 21
p53	Protein 53
pBlue	pBluescript <sup>R</sup> II SK (+/-)
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PFU	plaque forming units
p.i.	post infectionem
PRE	p53 responsive elements
PTCA	percutane transluminale Coronarangioplastie
p.t.	post transfectionem
PTx	Pertussistoxin
Rb	Retinoblastom-Protein
RCMV	rat ( Ratten-) Cytomegalievirus

ROS	reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Phase	Synthese-Phase
SmBm	Smooth muscle cell basal medium
SMCs	Smooth muscle cells (glatte Muskelzellen)
SP 1	Transkriptionsfaktor
SSC	Standard Sodiumcitrat
STE	Sodium, Tris, EDTA
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBE	Tris-borate-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline, Tween 20
TCA	Trichloracetylsäure
TE	Tris-EDTA-Puffe
TGF $\beta$	Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TK	Thymidinkinase
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TNS	Trypsin-Neutralisationslösung
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

## 8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Immundoppelfärbung einer In-Stent-Restenose <sup>103</sup>
- Abb. 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus
- Abb. 3: HCMV-Plaques in HFF Zellen
- Abb. 4: Synchronisierung der CASMCs durch FCS-Entzug
- Abb. 5: zeitliche Übersicht über die Zellsynchronisierung und die Wachstumsarretierung durch FCS-Entzug vor der Infektion
- Abb. 6: indirekte Immunfluoreszenzfärbung gegen hCMV
- Abb. 7: BrDU-Inkorporation der CASMCs nach Infektion mit hCMV  
MOI 0.1, MOI 1 und MOI 10
- Abb. 8: Kontrollverdau von pBlue IE1 und pBlue IE2
- Abb. 9: Kontrollverdau von pCMV IE1
- Abb. 10: Kontrollverdau von pCMV IE2
- Abb. 11: Adenovirus Plaques in 293 Zellen
- Abb. 12: Immunfluoreszenz gegen IE2 von Ad-IE2 infizierten CASMCs
- Abb. 13: Proteinkonzentrationen für Westernblot
- Abb. 14: <sup>3</sup>H Thymidininkorporation in IE2 transformierten CASMCs
- Abb. 15: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (PI-Färbung)
- Abb. 16: Quantifizierung des prozentualen Anteils der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase
- Abb. 17: Anteil der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen in %
- Abb. 18: Western Blot gegen Cyclin D1 (61kD)
- Abb. 19: Western Blot gegen CDK4 (34kD)
- Abb. 20: Western Blot gegen PCNA (34kD)
- Abb. 21: Versuchsablauf der Cotransfektion zur Untersuchung der Induktion des NF- $\kappa$ B durch IE1, IE2 und hCMV
- Abb. 22: Luciferaseassay mit hCMV infizierten CASMC
- Abb. 23: Luciferaseassay mit IE1, IE2 und PON transfizierten CASMCs
- Abb. 24: LDH Assay mit Ad-IE1, Ad-IE2, Ad- $\beta$ Gal infizierten CASMCs
- Abb. 25: Kinaseassay für den Cyclin A/ CDK 2 Komplex
- Abb. 26: Wirkung des hCMV

## 9 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn PD Rainer Wessely für die Überlassung des bearbeiteten Themas und die Betreuung und Führung während der Durchführung und Auswertung der Versuche herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Neumann für seine anfängliche Betreuung als Doktorvater, sowie für die Bereitstellung der technischen Möglichkeiten zur Durchführung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern der Forschungsgruppe Prof. Neumann und Dr. Seifert für ihre Unterstützung danken.

Ein großer Dank gilt meiner Freundin und Mitdoktorantin Angelika Dötterl, die mich zunächst einlernte und anschließend stets fachlich und moralisch äußerst engagiert unterstützte.

Vor allem aber möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Medizinstudium ermöglichten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.



## 10 Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Geburtsdatum, -ort: 7. November 1974, München

Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1980 - 1984            Grundschule Egling  
1984 - 1993            Gymnasium der Benediktiner, Kloster Schäftlarn  
1991                    Lycée Georges de la Tour in Nancy, Frankreich (4 Monate)  
1994                    Sprachenschule „Cambridge Academy of English“ in  
Cambridge, England ( 4 Monate)

### Universität:

1994 - 1996            Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians  
Universität München  
1996                    Physikum  
1996 - 2000            Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität  
München

### Examina:

1997                    1. Staatsexamen  
1999                    2. Staatsexamen  
2000                    3. Staatsexamen

### Praktisches Jahr:

Chirurgie:            Somerset Hospital an der University of Cape Town, Südafrika  
Pädiatrie:            Kinderklinik der TU München-Schwabing  
Centre Hospitalier Universitaire de Nice an der Université  
Sophia-Antipolis, Frankreich  
Innere Medizin:     Kardiologie im Deutschen Herzzentrum München  
Gastroenterologie im Krankenhaus Rechts der Isar, München

### ÄiP Tätigkeit und Assistenzzeit:

Seit 8/2001            Kinderklinik im Krankenhaus des III. Ordens, München