

**Herstellung rekombinanter Retroviren,
in vitro-Gentransfer und Expressionsanalyse
des NF2-Gens Merlin**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Karin Marlies Marion Schulze

aus Bad Ems

Düsseldorf 2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. H.-W. Müller

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 9.07.2001

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Neurofibromatose 2.....	1
1.2	Das NF2-Gen	1
1.3	Merlin – der Tumorsuppressor	3
1.4	Interaktionspartner von Merlin.....	5
1.5	Ziele der Arbeit	6
2	MATERIAL UND METHODEN.....	8
2.1.	Materialien.....	8
2.1.1	Bakterienstämme.....	8
2.1.2	Plasmide	8
2.1.3	Zelllinien	9
2.1.4	Medien und Zusätze.....	9
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	10
2.1.6	Antikörper und Fluorochrome	11
2.1.7	Oligodesoxynukleotide	12
2.2	Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1	Minipräparationen von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	14
2.2.2	Plasmid-Präparationskits	14
2.2.3	Präparation genomischer DNA aus kultivierten HeLa-Zellen.....	14
2.2.4	PCR-Nachweis integrierter Proviren	14
2.2.5	PCR-Nachweis von Mycoplasmenkontaminationen	15
2.2.6	Sequenzierungen	16
2.2.7	Proteinpräparation und –bestimmung.....	16
2.2.8	SDS-PAGE und Western Blot.....	17
2.2.9	Immunologischer Nachweis filtergebundener Proteine	17

2.3	Herstellung rekombinanter Retroviren.....	18
2.3.1	Retrovirusvektoren.....	18
2.3.2	Verpackungszelllinien	19
2.3.3	Transfektion von Retrovirusplasmiden in 293 eFNX Verpackungszellen: transiente Produktion ecotropher Viren	19
2.3.4	Infektion von PG13-Verpackungszellen mit ecotrophen Virusüberständen: stabile Produktion GALV-pseudotypisierter Viren	20
2.3.5	Infektion von 293 eFNX-Verpackungszellen mit PG13-Virusüberständen: stabile Produktion ecotropher Viren	20
2.3.6	Titration der Virusüberstände.....	21
2.4	Zellbiologische Methoden.....	21
2.4.1	Isolierung von humanen Schwanzzellen aus Schwannomen.....	21
2.4.2	Isolierung von humanen Schwanzzellen aus Nervenbiopsien.....	22
2.4.3	Kultur primärer Schwanzzellen	23
2.4.4	Kultur von Zelllinien.....	23
2.4.5	Transfektionen	23
2.4.6	Infektion der Zielzellen	24
2.4.7	Bestimmung der Infektionseffizienz.....	24
2.4.8	Einzelzellklonierung und FACS-Sortierung.....	25
2.4.9	Zellproliferationsassay	25
2.4.10	Immunzytochemie.....	26
2.4.11	Apoptose-Assay.....	27
3	ERGEBNISSE.....	29
3.1	Klonierung der retroviralen Merlin- und Merlin/EGFP-Konstrukte	29
3.2	Titration der rekombinanten GALV-pseudotypisierten Retrovirus- überstände	32
3.3	Infektion von Zelllinien und Ratten-Schwanzzellen	34
3.3.1	Effizienz der Infektion von Zelllinien und primären Ratten-Schwanzzellen.....	34
3.3.2	PCR-Nachweis integrierter Proviren im Genom infizierter HeLa-Zellen	35
3.3.3	Proliferationsdaten von Zelllinien und Ratten-Schwanzzellen nach Über- expression von Merlin	37

3.4	Charakterisierung von stabil Merlin überexprimierenden HeLa- und NIH3T3- Zellen <i>in vitro</i>	39
3.4.1	Analyse Merlin überexprimierender HeLa-Zellen.....	39
3.4.1.1	Proliferationsanalyse.....	39
3.4.1.2	Expressionsanalyse des Merlinproteins.....	45
3.4.1.3	EGFP-Lokalisierung.....	48
3.4.1.4	Zellmorphologie	49
3.4.1.5	Actinfärbung.....	50
3.4.1.6	Apoptose.....	51
3.4.2	Analyse Merlin überexprimierender NIH3T3-Zellen.....	51
3.4.2.1	Expressionsanalyse des Merlinproteins.....	51
3.4.2.2	Proliferationsanalyse.....	52
3.4.2.3	EGFP-Lokalisierung und Zellmorphologie	54
3.5	Charakterisierung von Merlin reexprimierenden NF2-Schwanzzellen.....	54
3.5.1	Optimierung der Infektionseffizienz.....	54
3.5.2	Infektion der Schwannomzellen NF2.6, NF2.11 und NF2.13.....	56
3.5.3	Infektionseffizienz	56
3.5.4	Expressionsanalyse des Merlinproteins.....	57
3.5.5	Proliferationsanalyse.....	58
3.5.5.1	Proliferationsergebnisse NF2.6.....	59
3.5.5.2	Proliferationsergebnisse NF2.11.....	60
3.5.5.3	Proliferationsergebnisse NF2.13.....	61
3.5.6	EGFP-Lokalisierung.....	62
3.5.7	Zellmorphologie	64
3.5.8	Actinfärbung.....	65
3.5.9	Apoptose.....	66
3.5.10	Expressionsanalyse des CD44-Rezeptors	68
4	DISKUSSION	70
4.1	Viraler Gentransfer	70
4.2	Proliferation	75
4.3	Apoptose	81
4.4	Zellmorphologie und Actinzytoskelett.....	84
4.5	Merlin/EGFP-Lokalisierung.....	87
4.6	CD44-Expression	88

4.7	Ausblick.....	90
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
6	LITERATUR.....	93
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	103

1 EINLEITUNG

1.1 Neurofibromatose 2

Neurofibromatose 2 (NF2) ist eine monogenetische, autosomale Erkrankung, die durch die Ausbildung von multiplen Tumoren des Nervensystems charakterisiert ist (Martuza und Eldridge, 1988; Evans *et al.*, 1992). Bei NF2-Patienten entwickeln sich insbesondere bilaterale Schwannzell-Tumore (Schwannome) des 8. Hirnnerven (Hörnerv), in geringerem Ausmaß aber auch Schwannome anderer zentraler und peripherer Nerven, Meningeome, Ependymome und Gliome (Kaiser-Kupfer *et al.*, 1989; Louis *et al.*, 1995; Gutmann *et al.*, 1997a). Patienten mit erblicher Neurofibromatose 2 besitzen durch eine Keimbahnmutation nur ein funktionelles NF2-Allel in ihren Körperzellen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in vielen NF2-Tumoren beide Allele mutiert sind (Bijlsma *et al.*, 1994; MacCollin *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 1994; Twist *et al.*, 1994). Das führte zu der Vermutung, dass eine spontane somatische Mutation zum Ausfall des zweiten NF2-Allels in einer Zelle führt und dadurch die Entwicklung eines Tumors auslöst. Untersuchungen verschiedener Familien mit Neurofibromatose 2 zeigten eine auffällige Genotyp-Phänotyp Korrelation. Patienten mit Mutationen die zu trunkierten NF2-Proteinen führen, weisen einen früheren Beginn und einen schwereren Verlauf der Krankheit auf als Patienten mit *missense*-Mutationen (MacCollin *et al.*, 1995; Parry *et al.*, 1996; Rutledge *et al.*, 1996).

Neben den erblich prädisponierten Schwannomen gibt es auch sogenannte sporadische Schwannome, die durch zwei unabhängige somatische Mutationen entstehen, die beide NF2-Allele einer Zelle inaktivieren (Arakawa *et al.*, 1994; Jacoby *et al.*, 1994; Rubio *et al.*, 1994).

1.2 Das NF2-Gen

Das NF2-Krankheitsgen wurde durch eine *positional cloning*-Strategie auf Chromosom 22q12 lokalisiert (Trofatter *et al.*, 1993; Rouleau *et al.*, 1993) und kodiert ein in vielen Geweben exprimiertes Protein namens Merlin oder Schwannomin (Schmucker *et al.*, 1997; den Bakker *et al.*, 1999). Merlin steht für **Moesin**, **Ezrin**, **Radixin-like protein**, da die aminoternale Hälfte des NF2-Proteins eine Sequenzidentität von etwa 63% zu den entsprechenden Bereichen von Moesin, Ezrin und Radixin, den sogenannten ERM-Proteinen

zeigt (Scherer und Gutmann, 1996; Gutmann *et al.*, 1997b; Gusella *et al.*, 1999). Die ERM-Proteine sind Mitglieder der Band 4.1-Proteinfamilie, die innerhalb der Säugetiere sehr konserviert sind und als Linker-Moleküle zwischen integralen Proteinen der Plasmamembran und dem Actinzytoskelett wirken (Bretscher *et al.*, 1997; Vaheri *et al.*, 1997; Tsukita *et al.*, 1999).

Das Merlinprotein wird von 17 Exons kodiert. Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Isoformen, die sich nur an ihrem C-terminalen Ende unterscheiden (Haase *et al.*, 1994; Hara *et al.*, 1994; Huynh *et al.*, 1994). Die Merlin-Isoform I (auch NF2-17 genannt) besteht aus den Exons 1-15 und 17 und umfasst 595 Aminosäuren, während Isoform II (oder NF2-16) anstelle des Exons 17 das Exon 16 enthält. Dieser Austausch führt aufgrund eines Terminationscodons im Exon 16 zu einem gegenüber NF2-17 verkürzten NF2-16 Protein von 590 Aminosäuren. Merlin besteht wie die ERM-Proteine aus drei Domänen (Abb. 1), einer aminoterminalen Region (Aminosäurereste 1-302), einer großen α -Helix Region (Aminosäurereste 303-478) und einer kleineren carboxylterminalen Region (Aminosäurereste 479-595), die sich aber deutlich vom Carboxylterminus der ERM-Proteine unterscheidet (Chishti *et al.*, 1998; Gutmann *et al.*, 1999a). Die hochaffine Actin-Bindestelle in der carboxylterminalen Region der ERM-Proteine (Henry *et al.*, 1995) fehlt zwar in beiden Merlin-Isoformen, aber es wurde eine Actin-Bindung über eine niedrigaffine Actin-Bindesequenz im Aminoterminal des Proteins nachgewiesen (Xu und Gutmann, 1998; Huang *et al.*, 1998).

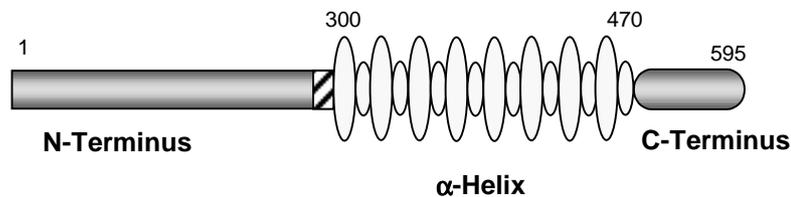


Abb. 1: Molekularer Aufbau des Merlinproteins

Merlin besteht wie die ERM-Proteine aus einer N-terminalen Domäne, einem α -Helix-Bereich und einer C-terminalen Domäne. Die hochaffine carboxyterminale Actin-Bindestelle der ERM-Proteine fehlt im Merlinprotein. Eine schwache Bindung an Actin ist aber über eine Actin-Bindesequenz im N-Terminus des Proteins möglich (schraffierter Bereich). Modifiziert nach Xu und Gutmann (1998).

Merlin ist wie die ERM-Proteine in F-Actin reichen Regionen der Plasmamembran von Kulturzellen und Geweben, wie Lamellipodien, Microspikes und Fokalkontakten lokalisiert (denBakker *et al.*, 1995a; Gonzalez-Agosti *et al.*, 1996; Stemmer-Rachamimov *et al.*, 1997a).

Doch weder die genaue Funktion von Merlin in der Schwannzelle, noch der Mechanismus, wie der Verlust von Wildtyp-Merlinprotein zur Ausbildung von Tumoren des Nervensystems führt, ist gegenwärtig bekannt.

1.3 Merlin - der Tumorsuppressor

Die Mutationsanalyse des NF2-Gens in erbten und sporadischen Schwannomen, Meningeomen und Mesotheliomen hat gezeigt, dass in den meisten Schwannomen (Evans *et al.*, 1992; Stemmer-Rachamimov *et al.*, 1997b; Koga *et al.*, 1998), in 30-60% der spontanen Meningeome (Lamszus *et al.*, 2000; Harada *et al.*, 1996) und in vielen Mesotheliomen (Bianchi *et al.*, 1995; Sekido *et al.*, 1995) beide Kopien des Gens mutiert und/oder deletiert sind. Aus diesem Grund wurde eine Tumorsuppressor-Aktivität des NF2-Proteins Merlin postuliert (Trofatter *et al.*, 1993; Rouleau *et al.*, 1993; Bianchi *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 1994; Twist *et al.*, 1994; Merel *et al.*, 1995), obwohl es bei den anderen Mitgliedern der Band 4.1-Proteinfamilie bisher keinen Hinweis auf eine Funktion bei der Zellwachstumskontrolle gibt.

In einer der ersten Untersuchungen zur möglichen Funktion von Merlin wurde gezeigt, dass die Überexpression des NF2-Proteins in v-Ha-Ras transformierten NIH3T3-Zellen den Ras-induzierten Phänotyp revertiert. V-Ha-Ras-transformierte Zellen bilden Kolonien in Softagar, weil sie keinen Kontakt mehr zu einer festen Unterlage benötigen und stellen das Zellwachstum auch bei Zell-Zell-Kontakten nicht ein. Durch die Überexpression von Merlin wird das Verankerungs-unabhängige Wachstum und der Verlust der Kontakt Inhibition der NIH3T3-Zellen wieder aufgehoben (Tikoo *et al.*, 1994). Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit anderen Actinzytoskelett assoziierten Proteinen gemacht, die bei der Transformation von Zellen und der Tumorentwicklung eine Rolle spielen. So revertiert die Überexpression von Vinkulin und α -Actinin den malignen Phänotyp von SV40-transformierten Zellen (Rodriguez Fernandez *et al.*, 1993; Gluck *et al.*, 1993) und Tropomyosin-I sowie Gelsolin revertieren die maligne Transformation, die von Ras-Mutanten wie v-Ha-Ras und v-Ki-Ras ausgelöst wird (Prasad *et al.*, 1993; Mullauer *et al.*, 1993).

Merlins Rolle als ein negativer Regulator des Zellwachstums wurde durch die Experimente von Lutchman und Rouleau (1995) unterstützt, die zeigten, dass die Überexpression des NF2-Proteins in hochkonfluenten NIH3T3-Zellkulturen zu einer Reduktion des Zellwachstums auf etwa 30% des Wachstums von Kontrollzellen führte.

Huynh und Pulst zeigten (1996), dass eine verminderte Expression des Merlinproteins durch den Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden in STS26T-Zellen (humane

Schwannomzelllinie) und T98G-Zellen (humane Glioblastomazelllinie) zu einer Abrundung der Zellen und zum Ablösen von der Kulturschale führt. Zusätzlich wurde ein 1.3-facher Anstieg der Proliferationsrate von STS26T-Zellen, die mit Antisense-Oligonukleotiden behandelt wurden, gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt.

Weitere Untersuchungen von Sherman *et al.* (1997a) ergaben, dass nur eine Überexpression der Merlin-Isoform I (NF2-17) und nicht der Isoform II (NF2-16) das Zellwachstum von RT4- und JS1-Ratten-Schwannomazellen vermindert. Ebenso war nach Injektion von Merlin-Isoform I oder Isoform II übererexprimierenden Ratten-Schwannomzellen in Nacktmäuse nur die Tumorentwicklung aus NF2-17-übererexprimierenden Ratten-Schwannomzellen verlangsamt. Auch die Expression von mutierten oder N- bzw. C-terminal trunkierten Merlinproteinen hat keinen Einfluss auf die Proliferation von Ratten-Schwannomzellen (Sherman *et al.* 1997a). Demgegenüber kann durch die gleichzeitige Expression ungefähr gleicher Mengen C-terminal und N-terminal verkürzter Merlinproteine das Zellwachstum inhibiert werden. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass für eine Tumorsuppressor-Funktion von Merlin intramolekulare Wechselwirkungen zwischen amino- und carboxylterminalen Domänen im Protein notwendig sind, und dass diese Interaktionen durch verschiedene Mutationen, wie z.B. einer Deletion von Exon 17, verhindert werden (Sherman *et al.*, 1997a).

Die Hypothesen wurden durch Gutmann *et al.* (1998) untermauert, die zeigten, dass verschiedene NF2-Patientenmutationen intramolekulare Assoziationen im Merlinprotein verhindern, und dass die Überexpression dieser mutierten Merlinproteine in RT4- Ratten-Schwannomzellen nicht zu einer Verminderung der Proliferationsrate führt. Andererseits konnten sie auch nachweisen, dass bei bestimmten *missense*-Mutationen intramolekulare Bindungen möglich sind, diese Selbstassoziationen jedoch keine Wirkung auf die Zellproliferation haben. Das macht es wahrscheinlich, dass für die vermutete Tumorsuppressor-Funktion zusätzliche Interaktionen des Merlinproteins mit einem oder mehreren Effektormolekülen notwendig sind und dass diese Interaktionen durch Mutationen im Merlinprotein gestört werden. In nachfolgenden Bindungsstudien untersuchten Gutmann *et al.* (1999a), welche Proteinbereiche für intramolekulare Interaktionen unerlässlich sind. Sie fanden heraus, dass produktive, d.h. Zellwachstum beeinflussende Interaktionen im Merlinprotein nur entstehen, wenn N-terminal die Aminosäuren 8-308 und im C-Terminus die Aminosäuren 580-595 (Exon 17) unverändert vorliegen.

Ihre Untersuchungen resultierten in einem Modell, das zwei Konformationen des Merlinproteins beschreibt, eine „geschlossene“ und eine „offen“ Form (Abb. 2). In der „offenen“ Protein-Konformation sind N- und C-Terminus des Proteins frei und Merlin hat keine Proliferations-hemmende Funktion. Die „geschlossene“ Konformation, bei der N- und

C-Terminus des Proteins miteinander interagieren, ist die das Zellwachstum inhibierende Form, die durch eine Selbstassoziation des N-Terminus stabilisiert wird.

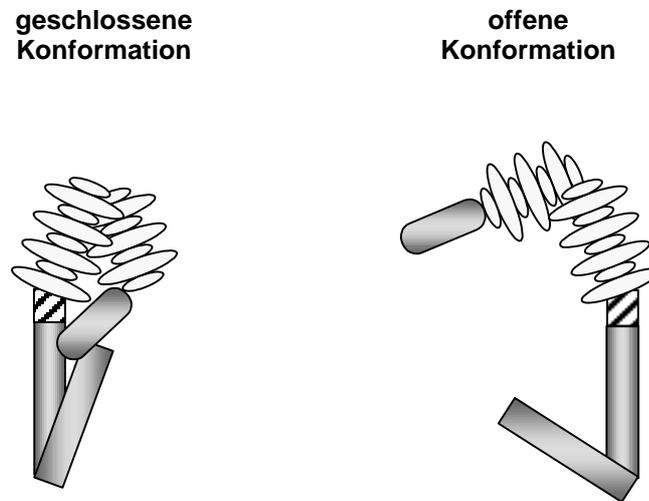


Abb.2: Modell der Merlin-Selbstassoziation

Merlin liegt in der Zelle in zwei Konformationen vor, einer geschlossenen, das Zellwachstum inhibierenden Form und einer offenen Form. Für die Ausbildung der geschlossenen Form sind zwei Interaktionen notwendig. Zum einen eine Assoziation zwischen dem N- und dem C-Terminus des Proteins und zum anderen eine Selbstassoziation des N-Terminus. N-Terminus: schattiertes Rechteck, C-Terminus: schattiertes Oval. Modifiziert nach Gutmann *et al.* (1999a).

Die Beobachtungen führten zu folgender Hypothese zur Funktion von Merlin:

- (i) für die Tumorsuppressor-Funktion von Merlin ist eine sogenannte geschlossene Konformation notwendig, in der N-Terminus und C-Terminus des Merlinproteins interagieren. Diese Interaktion ist nur möglich, wenn ein vollständiger N-Terminus (Aminosäurereste 8-308) und C-Terminus (Exon 17, Aminosäurereste 580-595) vorliegen und wird durch eine Selbstassoziation des N-Terminus stabilisiert.
- (ii) zusätzlich muss in der geschlossenen Konformation eine Bindung an ein oder mehrere noch nicht identifizierte Effektormoleküle erfolgen, um eine Weiterleitung des Zellwachstum-inhibierenden Signals zu ermöglichen.

1.4 Interaktionspartner von Merlin

Auf der Suche nach Effektormolekülen wurden verschiedene Interaktionspartner von Merlin identifiziert. Eine Kolkalisierung von Merlin und F-Actin war durch initiale immunzyto-

chemische Untersuchungen bekannt (den Bakker *et al.*, 1995a; Gonzales-Agosti *et al.*, 1996; Stemmer-Rachamimov *et al.*, 1997a). Xu und Gutmann (1998) zeigten, dass Merlin *in vitro* an Actinfilamente bindet und identifizierten als Actin-Bindesequenz die N-terminalen Aminosäuren 280-340. Da dieser Bereich mit den N-terminalen Aminosäuren überlappt, die für die Ausbildung der intramolekularen Assoziationen notwendig sind, ist eine Regulation der Tumorsuppressor-Funktion von Merlin über die Bindung an Actin denkbar.

Eine Kolkalisierung von Merlin mit dem ECM-Rezeptor CD44 wurde immunzytochemisch in COS-, CHO- und 293-Zellen beobachtet (Sainio *et al.*, 1997). Die entsprechende Interaktion von Merlin mit CD44s, der 85 kDa CD44-Standardisoform, wurde in Ratten-Schwannomzellen nachgewiesen, jedoch interessanterweise nur dann, wenn die Zellkulturen konfluent waren (Herrlich *et al.*, 2000). Die Überexpression von Merlin in diesen Ratten-Schwannomzellen führt zur Wiederherstellung der Kontaktinhibition und zur Reduktion der Kolonienzahl in Softagar. Es wird daher vermutet, dass CD44s beim Prozess der Kontaktinhibition als Zelloberflächen-„Sensor“ wirken könnte und durch seine Bindung an Merlin dessen putative regulatorische Funktion während der Zellwachstumskontrolle aktiviert.

Durch Immunpräzipitationsstudien und *yeast two hybrid*-Analysen wurden das Actin bindende Protein β II-Spectrin (Fodrin; Scoles *et al.*, 1998), der Rezeptor β 1-Integrin (Obremski *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000), das vom Leberzellen-Wachstumsfaktor regulierte Tyrosinkinase-Substrat HRS (Scoles *et al.*, 2000; Gutmann *et al.*, 2001) und der Kofaktor EBP50 (ERM binding protein) des Na^+ - H^+ -Austauschers (Murthy *et al.*, 1998; Gonzalez-Agosti *et al.*, 1999) als weitere mögliche funktionelle Interaktionspartner von Merlin identifiziert. Es wird angenommen, dass EBP50 als multifunktionelles Adaptorprotein agiert und eine Rolle bei der Ausbildung von Signaltransduktions-Komplexen spielt (Stemmer-Rachamimov *et al.*, 2001).

Die Bedeutung dieser Interaktionen in bezug auf die Tumorsuppressor Aktivität von Merlin und die NF2-Pathogenese ist noch weitgehend unbekannt.

Möglicherweise ist Merlin an der Formierung großer Proteinkomplexe zwischen Plasmamembran und Actinzytoskelett beteiligt, die Zellmorphologie, Zelladhäsion und Zellwachstum beeinflussen. Mutationen im Merlinprotein könnten zur Zerstörung dieser Merlin-vermittelten Proteinkomplexe und in der Folge zu unkontrolliertem Zellwachstum führen (Huynh und Pulst, 1996; Murthy *et al.*, 1998).

1.5 Ziel der Arbeit

Charakteristisch für die Erkrankung Neurofibromatose 2 ist die Ausbildung von Schwannzelltumoren. Schwannzellen die aus Tumoren von NF2-Patienten isoliert wurden, weisen in

Kultur gegenüber normalen Schwannzellen aus Nervenbiopsien häufig eine erhöhte basale Proliferation und immer eine veränderte Morphologie auf (Pelton *et al.*, 1998; Rosenbaum *et al.*, 1998). Während normale humane Schwannzellen im allgemeinen spindelförmig und bipolar sind, haben NF2-Schwannzellen eine multipolare Form mit vielen langen Zellausläufern und wachsen in mehreren Zellschichten.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden nahezu alle *in vitro* Arbeiten, die sich mit der Funktion von Merlin beschäftigen mit Hilfe verschiedener Zelllinien durchgeführt. Die vorliegende Arbeit ist die erste Untersuchung dieser Art, die sich mit den Effekten einer Reexpression von Merlin in Schwannzellen aus NF2-Tumoren, d.h. Schwannzellen mit Mutationen im Merlingen, beschäftigt, was zum einen in der beschränkten Verfügbarkeit von NF2-Tumormaterial und zum anderen in der schwierigen Kultivierung von adulten humanen Schwannzellen begründet ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst der effiziente Transfer der Merlin-cDNA in NF2-Schwannzellen. Um stabil und effizient NF2-Zellen zu infizieren wurden rekombinante Retroviren verwendet, die die Merlin- und EGFP- (grün-fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*) cDNA getrennt voneinander oder als Fusionsprotein enthielten. Der Einsatz von Retroviren als effiziente Vehikel für den Gentransfer (Miller, 1992; Mulligan, 1993) und die Überwachung von Gentransfer und Expression über das Markerprotein EGFP (Chalfie *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1996) sind in anderen Zellsystemen bereits erfolgreich angewendet worden. Eine Retrovirus-vermittelte erfolgreiche und stabile Expression des Merlinproteins in NF2-Schwannzellen sollte dann nachfolgend die Grundlage bieten, Effekte der Merlinreexpression in diesen Zellen *in vitro* zu untersuchen. Um zu überprüfen, ob die erhöhte basale Proliferation und der abnorme Phänotyp von NF2-Schwannzellen durch die Reexpression des Merlinproteins revertiert werden kann, sollte das Hauptaugenmerk auf Veränderungen in der Zellproliferation, der Apoptose und der Zellmorphologie gelegt werden.

Analoge Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit an HeLa-Zellen durchgeführt. Das geschah zum einen, weil Effekte der Merlin-Überexpression auf die Proliferationsrate und die Morphologie von HeLa-Zellen noch nicht untersucht waren und Hinweise auf mögliche generelle, zelltypunabhängige Proteinfunktionen liefern könnten, und zum anderen, um den Gentransfer und die sich anschließenden Analysen an einem unbegrenzt verfügbaren Zelltyp zu etablieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

XL1-blue: EndA1, hsdR17 (r_K^- , m_K^+), supE44, thi-1, λ^- , recA1, gyrA96, relA1, $\Delta(\text{lac})$, [F', ProAB, lacI^qZDM15, Tn10(tet^R)]
(Bullock *et al.*, 1987)

DH5 α : endA1, hsdR17, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, βlac , U196, ($\phi 80$, lacZ Δ M15)
(Hanahan *et al.*, 1983)

ONE SHOT TOP10:

F⁻, mrcA Δ (mrr-hdsRMS-mcrBC), $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$, ΔlacX74 , deoR, recA1, araD139, $\Delta(\text{ara-leu})7697$, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG
(Invitrogen)

2.1.2 Plasmide:

pBluescript II KS (Stratagene)

MEG, MIEG Retrovirusplasmide, Derivate des Maus-Stammzellvirus MSCV 2.1 (Hawley *et al.*, 1994), von H. Hanenberg zur Verfügung gestellt (Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie der Universität Düsseldorf)

pBDNF Plasmid mit der Merlin-cDNA, von L. Kluwe zur Verfügung gestellt (Abteilung für Neurochirurgie des Universitätshospital Eppendorf, Hamburg)

2.1.3. Zelllinien

HeLa-Zellen	Zervixkarzinom-Epithelzelllinie American Type Culture Collection (ATCC)
Marve SV40	hum. Fibroblastenlinie, pers. Gabe H. Hanenberg
NIH3T3	Mausfibroblastenlinie (ATCC)
PG13	retrovirale Verpackungszelllinie, Maus-Fibroblasten, (Miller <i>et al.</i> , 1991)
293T-Zellen	hum. Nierenfibroblastenzelllinie, SV40 <i>Large T-Antigen</i> im Genom integriert, (Du Bridge <i>et al.</i> , 1987)
293eFNX	retrovirale Verpackungszelllinie, hum. Nierenfibroblastenzellen (Grignani <i>et al.</i> , 1998)

2.1.4 Medien und Zusätze

Zellkulturmedium für HeLa-, NIH3T3-, 293eFNX-, 293T-, PG13-Zellen sowie primäre Ratten-Schwanzzellen und humane Fibroblasten:

- Dulbecco's modified eagle's Medium 1.0 g/L Glukose
(DMEM, Gibco/BRL)
- 10% (v/v) Fötales Kälberserum (FCS, Gibco/BRL)
- 1% (v/v) Glutamin (200mM)
- 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (5000 U)

Für die Kultivierung von primären Ratten-Schwanzzellen wurde dem Medium noch 2 μ M Forskolin (Sigma) zugegeben.

Kulturmedium für NF2-Schwanzzellen:

- DMEM 4.5 g/l Glukose (Gibco/BRL)
- 10% (v/v) FCS (Gibco/BRL)
- 500 U/ml Penicillin/Streptomycin
- 0.5 μ M Forskolin (Sigma)
- 10nM β 1-Heregulin₁₇₇₋₂₄₄ (Mark Slikowski, Genentech)
- 0.5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX, Sigma)
- 2.5 μ g/ml Insulin (Sigma)

Das in der Zellkultur verwendete fötale Kälberserum (FCS) wurde 30min bei 56°C hitzeinaktiviert.

Ciprobay	5µl/ml Medium (Bayer)
Dispase I	1.2U/ml (Roche)
Maus-Laminin	4µg/ml (Gibco/BRL)
Kollagenase TypI	160U/ml (Sigma)
Protaminsulfat	5µg/ml Medium (Sigma)
Poly-L-Lysin	1mg/ml (Sigma)

2.1.5 Puffer und Lösungen

Acrylamidlösung	30% Stammlösung, 29 % (w/v) Acrylamid und 1 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (BioRad)
Anodenpuffer I	0.3M Tris/HCl, 20% Methanol
Anodenpuffer II	0.02% (w/v) Tris/HCl, 20% Methanol
Blocklösung	3% (w/v) Milchpulver, 1% BSA in TBS
Chloroform/Isoamylalkohol	Chloroform und Isoamylalkohol werden in einem Verhältnis von 24:1 gemischt
DAPI	Stammlösung: 10mg DAPI (Roche) in 3ml abs. Ethanol im Ultraschallbad lösen und anschließend in 500ml PBS lösen, Gebrauchslösung 1:10 mit PBS verdünnen
Dispase	30U (Roche) in 1.25 ml dH ₂ O
DNA-Farbmarker	0.1% (w/v) Bromphenol-Blau, 0.1% (w/v) Xylene-Cyanol FF, 50% (v/v) Glycerol in 1x TBE
FDA-Lösung (0.042%)	42mg FDA (Sigma) in 100ml Aceton, Gebrauchslösung 1:10 mit DMEM verdünnen
Forskolin	1mg (Sigma) in 1.218 ml abs. Ethanol
IBMX	250mg (Sigma) in 22.5ml 50% Ethanol
Insulin	4mg (Sigma) in 1ml PBS/25µl 1N HCl
Kathodenpuffer	0.04M 6-Aminohexansäure, 0.01% (w/v) SDS, 20% Methanol
Kollagenase Typ I	16.000U (Sigma) in 1ml DMEM
Laminin-Lösung	200µg (Gibco/BRL) in 50ml PBS
Mercaptoethanolpuffer	100mM 2-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 62,5mM Tris/HCl pH 6,7

PBS	150mM NaCl, 10mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.2
PFA (4%)	4g PFA in 100ml PBS, bei 50-55°C lösen
Poly-L-Lysin Lösung	50mg (Sigma) in 50ml PBS
Propidiumjodid	5µg (Sigma) in 1ml PBS
Proteaseinhibitormix	2mM Pefablock, 1µg/ml Leupeptin 1µg/ml Pepstatin, 5mM EDTA (Sigma)
RIPA-Puffer	50mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% (w/v) NP40, 0.1% (w/v) SDS, 0.5% (w/v) Deoxycholat
Sammelgelpuffer	125mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1% SDS
SDS-Laufpuffer	250mM Glyzerin, 25mM Tris, 0.1% SDS
SDS-Probenpuffer	60mM Tris-HCl pH 6.8, 10% (v/v) Glyzerin, 2% (w/v) SDS, 100mM DTT, 1% (w/v) Bromphenolblau
TBE-Puffer	90mM Tris, 90mM Borsäure, 2mM EDTA pH 8,3
TBS-Puffer	20mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl
TE-Puffer	10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.0
Trenngelpuffer	370mM Tris/HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS

2.1.6 Antikörper und Fluorochrome

Kaninchen-anti-Merlin/N-term.-AK A19 (Santa Cruz)

Kaninchen-anti-Merlin/C-term.-AK C18 (Santa Cruz)

Kaninchen-anti-Merlin (WA 30, pers. Gabe D.H. Gutmann)

Kaninchen-anti-GFP-AK (Molekular Probes)

Maus-anti-GFP-AK, monoklonal (Clontech)

Maus-anti-CD44-AK (Hermes-3, pers. Gabe Prof. Jalkanen)

Ziege-anti-Kaninchen, Cy3 gekoppelt (Jackson Immuno)

Maus-anti-BrdU, monoklonal, FITC gekoppelt (Pharmingen)

Ziege-anti-Kaninchen-AK, Peroxidase gekoppelt (Southern Biotechnology Associates, Inc.)

Ziege-anti-Kaninchen-AK, biotinyliert (Vector)

Ziege-anti-Maus Immunoglobuline, Peroxidase gekoppelt (DAKO)

Fluorescein-Avidin D (Vector)

Phalloidin-Texas-Red (Molecular Probes)

Phalloidin-FITC (Molecular Probes)

2.1.7 Oligodesoxynukleotide

Neben den Standardprimern (T3, T7, M13 und M13revers) wurden die folgenden von der Firma MWG Biotech bezogenen Primer für Sequenzierungen benutzt:

Von der Merlin-cDNA abgeleitete Primer:

Primername	Primersequenz	Bindestelle in der Merlin-Sequenz Acc.No. L11353
Merlin-intern-P1	5'-ATC CTG AGA ATG CTG AAG AG-3'	Basen 521-540
Merlin-intern-P2	5'-CAA GAA GTG AAA GGT GAC TG-3'	491-510
Merlin-intern-P3	5'-AGA TGT ACG GTG TGA ACT AC-3'	863-882
Merlin-intern-P4	5'-GCA TCC ACT CCA AGC AGC AG-3'	973-992
Merlin-intern-P5	5'-GGC TGA ACG CAC GAG GGA TG-3'	1263-1282
Merlin-intern-P6	5'-AGA CCG CAT CAG TGC TTC GT-3'	1391-1410
Merlin-intern-P7	5'-AGC TCC TGG AGA TTG CCA CC-3'	1631-1710
Merlin-intern-P8	5'-GCT TGG TAT GTC AGG AGG CA-3'	1691-1710
Merlin-intern-P9	5'-GAA GAG CTC TAG CAG GTG AC-3'	1996-2015

Primer die in Vektorsequenzen binden:

Primername	Primersequenz	Bindestelle in der Vektorsequenz
5'-MCS-pBluescript	5'-GAT ATC GAA TTC CTG CAG CC-3'	pBluescript MCS
3'-MEG/MIEG	5'-GCA GGT CGA CGG ATC TGA GT-3'	siehe Abb. 3 Pfeil 1
3'-MEG/MIEG 3	5'-GCC ACA AGT TCA GCG TGT CC-3'	siehe Abb. 3 Pfeil 2
5'-MEG/MIEG	5'-GCC CTC ACT CCT TCT CTA GG-3'	siehe Abb. 3 Pfeil 3
5'-MEG/MIEG 2	5'-ATC ACA TGG TCC TGC TGG AG-3'	siehe Abb. 3 Pfeil 4
3'-IRES II	5'-GGT ACC GTC GAC TGC AGA AT-3'	siehe Abb. 3 Pfeil 5

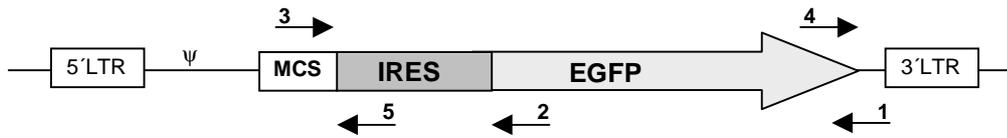


Abb.3

Schematische Darstellung der Bindestellen der verschiedenen Primer in den Retrovirusvektoren MIEG bzw. MEG (MEG enthält keine IRES-Sequenz)

Primer zur Klonierung:

Zur Klonierung des Klons LMEG wurde die Merlin-Sequenz mit den folgenden Primern aus dem Merlin-Klon #4 mittels PCR synthetisiert. Die Primer enthalten Schnittstellen der Restriktionsenzyme Age I und Eco RI für weitere Klonierungsschritte.

	Age I	<i>Start der Merlin-Sequenz</i>
3'Merlin/Age I	5'-ACT GCA GAC CGG TGC <u>GAG CTC TTC AAA GAA GGC</u> -3'	
5'Merlin/ATG	5'-TGA CGT GAA TTC <u>ATG GCC GGG GCC ATC G</u> -3'	
	Eco RI	<i>Start der Merlin-Sequenz</i>

Primer für die PCR zur Kontrolle auf Mycoplasmenkontaminationen kultivierter Zellen:

GPO-3	5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3'
M650	5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Chowdhury *et al.* (1991)

0.5 ml Übernacht-Kultur und 0.5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurden für 1 min mit maximaler Geschwindigkeit gevortext und zur Phasentrennung 5 Minuten bei 4°C mit 10.000g zentrifugiert. Die plasmidhaltige wäßrige Phase wurde abgenommen und mit 400 µl Isopropanol 20 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation (5 min, 10.000g, 4°C) wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, und das getrocknete Nukleinsäurepellet in 50 µl TE-Puffer oder dH₂O resuspendiert.

2.2.2 Plasmid-Präparations-Kits (Qiagen)

Die Durchführung von Mini- und Maxi-Plasmid-Präparationen mit den "Plasmid-Präparations-Kits" der Fa. Qiagen erfolgte laut Protokoll des Herstellers und wurde zur Isolation sehr reiner Plasmid-DNA eingesetzt.

2.2.3 Präparation genomischer DNA aus kultivierten HeLa-Zellen

Zum Nachweis integrierter Proviren wurde die genomische DNA infizierter HeLa-Zellen isoliert. Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert, pelletiert und das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen. Die Präparation der genomischen DNA erfolgte nach Verdau mit 2U/ml Proteinase K und 100µg/ml RNase A- (beides Fa. Roth) mit BL-Puffer und Elutionssäulen der Firma PeqLab.

2.2.4 PCR-Nachweis integrierter Proviren

Der Nachweis integrierter Retrovirusvektor-Sequenzen (Provirus) im Genom von infizierten HeLa-Zellen erfolgte über PCR, mit Primerpaaren, die in der Merlinsequenz bzw. in der EGFP- oder der IRES-Sequenz binden. Folgende Ansätze wurden pipettiert:

1µg	genomische DNA
200µM	dNTP-Mix (Roche)
0.5µM	Primer
1×	PCR-Puffer (Qiagen)
1×	Lösung Q (Qiagen)
2.5U	Hot Star Taq-Polymerase (Qiagen)
ad 100µl	dH ₂ O

Die PCR-Ansätze wurden mit den Primern Merlin-intern-1 und Merlin-intern-8 (LM), Merlin-intern-P4 und 5´MEG/MIEG 2 (LEGM), Merlin-intern-P7 und 3´MEG/MIEG 3 (LMEG) sowie Merlin-intern-P5 und 3´IRES 2 (LMIEG) durchgeführt (vgl. 2.1.7). Die Annealingtemperatur zum Nachweis von LMEG-Sequenzen betrug 58°C, bei den anderen drei Ansätzen 52°C.

PCR-Profil:

<u>1×</u>	<u>30×</u>		<u>1×</u>
95°C	94°C	1min	72°C
15min	52°C/58°C	1min	10min
	72°C	2min	

2.2.5 PCR-Nachweis von Mycoplasmenkontaminationen

(modifiziert nach Hopert et al., 1993)

Zur Kontrolle der Zellkulturen auf Mycoplasmenkontamination wurde regelmäßig Medium von den Zellen entnommen und eine PCR durchgeführt. Das Medium wurde dazu 1:10 mit 0.5M Tris-HCL pH 9.0 verdünnt. Als Positivkontrolle wurde kontaminiertes Medium (in Aliquots bei -20°C lagerbar) benutzt.

10 µl verdünntes Medium wurden in folgenden Ansatz gegeben:

50mM	KCl
10mM	Tris-HCl pH 9.0
1.5mM	MgCl ₂
0.2mM	dNTP-Mix (Roche)
0.15µM	Primer GPO-3 bzw. M650
2.5U	Taq-Polymerase (Qiagen)
ad 90 µl	dH ₂ O

PCR-Profil:

<u>1x</u>	<u>40x</u>		<u>1x</u>
94°C	94°C	1min	72°C
5min	55°C	1min	10min
	72°C	2min	

2.2.6 Sequenzierungen

Die Sequenzierung der verschiedenen Merlin-Konstrukte erfolgte semiautomatisch unter Verwendung des Kapillarsequenzierers ABI 310 (Genetic Analyser, Perkin Elmer). Der Sequenzieransatz bestand aus:

1.0µg	Vektor-DNA
2.5pmol	Primer
8.0µl	Sequenziermix (Big Dye Terminator Cycle Sequencing, Perkin Elmer)
ad 20µl	dH ₂ O

PCR-Profil:

<u>25x</u>	
96°C	30s
3°C unter dem T _m -Wert des Primers	60s
60°C	4min

Nicht eingebaute Dideoxynukleotide wurden über Centrisep-Säulen (Perkin Elmer) abgetrennt, 6µl des aufgereinigten Ansatz mit 18µl Templatesuppression-Reagenz (Perkin Elmer) gemischt und nach dreiminütiger Denaturierung sequenziert.

2.2.7 Proteinpräparation und -bestimmung

Zur Präparation von Proteinen aus kultivierten Zellen wurden subkonfluente Zellen abtrypsiniert, pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in RIPA-Puffer (inkl. Proteaseinhibitoren) aufgenommen und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C lysiert. Kerne und Zelltrümmer wurden durch 15 minütige Zentrifugation bei 10.000g abgetrennt und die Proteinlösung für weitere Analysen bei –20°C gelagert.

Bestimmungen der Proteinkonzentration erfolgten mit dem Detergenz-verträglichen DC Protein Assay der Firma Biorad, als Standard wurden verschiedene Rinderalbumin-Verdünnungen bekannter Konzentration verwendet.

2.2.8 SDS-PAGE und Western Blot

(nach Laemmli, 1970)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in linearen Gradientengelen (Polyacrylamidkonzentration von 5-10%) in einer Protean II Gelapparatur (Biorad, 18×16cm Gelformat). Es wurden 50µg Protein pro Spur aufgetragen.

Nach beendetem Gellauf wurden die Proteine in einer Semidry-Blot-Apparatur (2117 Multiphor, Pharmacia) für 2h mit 0.8mA/cm² auf eine Nitrocellulosemembran (ECL-NC Amersham-Pharmacia) übertragen. Der Transfer erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Größe der Proteine in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Khyse-Andersen, 1984). Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurden die Nitrocellulosemembranen mit Ponceau Rot S (Sigma) behandelt. Die reversible Anfärbung wurde danach durch mehrmaliges Waschen mit dH₂O entfernt.

2.2.9 Immunologischer Nachweis filtergebundener Proteine

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die NC-Blots über Nacht bei 4°C in Blocklösung (3% Magermilchpulver/1% BSA/TBS) inkubiert und dann 4 × 15 min mit 0.05% Tween/TBS gewaschen. Die Umsetzung mit dem spezifischen Erstantikörper erfolgte in 10% Blocklösung/TBS für 1h bei RT. Anschließend wurde wieder 4 × 15 min mit 0.05% Tween/TBS gewaschen und 1h bei RT mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden nach erneutem Waschen (4 × 15 min mit 0.05% Tween/TBS) mit dem ECL-System (Amersham) detektiert. Dazu wurden gleiche Volumina Detektionslösung 1 und 2 gemischt, für eine Minute auf die NC-Blots gegeben und mit Filterpapier abgesaugt. Die Exposition erfolgte i.d.R. für 15 Sekunden bis 5 Minuten unter Verwendung spezieller ECL-Filme.

Die verwendeten Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen benutzt:

Kaninchen-anti-Merlin/N-term.-AK A19 (Santa Cruz)	1:500
Kaninchen-anti-Merlin/C-term.-AK C18 (Santa Cruz)	1:2000
Kaninchen-anti-Merlin (WA 30, pers. Gabe D.H. Gutmann)	1:500
Maus-anti-GFP-AK, monoklonal (Clontech)	1:500
Maus-anti-CD44-AK (Hermes-3, pers. Gabe S. Jalkanen)	1:4000
Ziege-anti-Kaninchen-AK, Peroxidase gekoppelt	1:10.000
Ziege-anti-Maus Immunglobuline, Peroxidase gekoppelt (DAKO)	1:2500

Vor einer erneuten Verwendung der NC-Blots wurden die Immunkomplexe durch Inkubation in Mercaptoethanolpuffer (30min bei 60°C) gelöst und die Blots 2 × 10min mit TBS/0.05% Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Blots überprüft, indem nach Blockieren (mind. 1h) mit dem zuvor verwendeten Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert wurde. Nicht entfernte Immunkomplexe wurden nach einem erneuten Waschschrift mit dem ECL-System (Amersham) detektiert.

2.3 Herstellung rekombinanter Retroviren

2.3.1 Retrovirusvektoren

Die verwendeten Replikations-inkompetenten Retrovirusvektoren enthalten nur die für den Lebenszyklus wichtigen *cis*-wirkenden viralen Elemente, die Signale für (i) Verpackung (Ψ), (ii) reverse Transkription und (iii) Integration der einklonierten cDNA, sowie Promotor-, Enhancer- und Polyadenylierungssequenzen (in den viralen LTRs).

Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten cDNAs wurde über virale Sequenzen reguliert.

2.3.2 Verpackungszelllinien

Die viralen Strukturgene *gag* (Matrixprotein, Capsidprotein und Nukleocapsidprotein), *pol* (Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) und *env* (Oberflächen-Glykoproteine) werden nicht von den verwendeten Retrovirusvektoren kodiert, sondern von sogenannten Verpackungszelllinien, die diese Sequenzen stabil im Genom integriert enthalten. Das Verpackungssignal Ψ , das für die Verpackung der viralen RNA-Genome in die Viruspartikel notwendig ist, wurde in den Sequenzen der Strukturgene deletiert, so daß die produzierten rekombinanten Viruspartikel keine Information für die Strukturgene enthalten und daher Replikations-inkompetent sind.

Durch Transfektion von Retrovirusvektoren in Verpackungszellen sind alle für die Produktion von rekombinanten Retroviren notwendigen Elemente in den Zellen vorhanden. Fremd-DNA, die in ein solches Retrovirusplasmid kloniert wurde, wird somit in Viruspartikel verpackt.

Die verwendeten **293 eFNX-Verpackungszellen** (Grignani *et al.*, 1998) enthalten die viralen Sequenzen *gag*, *pol*, *env*, *E1A* und *T-Antigen*. In diesen Zellen lassen sich sog. ecotrophe Virusüberstände herstellen, mit denen sich Nagerzellen infizieren lassen.

Die Transfektion der verschiedenen Retrovirusplasmide in die 293 eFNX Zellen erfolgte zur transienten Produktion von 293 eFNX-Virusüberstände um mit diesen Virusüberständen PG13-Verpackungszellen (Maus-Fibroblastenzellen) zu infizieren, da sich PG 13-Zellen im Gegensatz zu 293 eFNX-Zellen schlecht transfizieren lassen (Soneoka *et al.*, 1995).

PG13-Mausfibroblasten-Verpackungszellen (Miller *et al.*, 1991) enthalten ebenfalls die viralen Strukturproteine und sind mit dem *gibbon ape leukemia virus* (GALV) Envelope-Protein pseudotypisiert, d.h. die produzierten Viren enthalten dieses Envelope-Protein in ihrer Virushülle. GALV-Virusüberstände infizieren über das GALV Envelope-Protein viele verschiedene Spezies, wie z.B. Ratte und Mensch, nicht aber Maus.

2.3.3 Transfektion von Retrovirusplasmiden in 293 eFNX-Verpackungszellen: transiente Produktion ecotropher Viren

Für die Transfektion wurden 10cm-Kulturplatten mit konfluenten 293 eFNX-Zellen mit einer Mischung aus 20µg DNA und 60µl Fugene™ 6 (Mischung verschiedener Lipide, Roche) in einem Gesamtvolumen von 5ml Kulturmedium inkubiert. Nach 8h erfolgte der Zusatz von weiteren 5ml frischen Mediums. 24h nach der Transfektion wurde das Medium vollständig

gewechselt und die Inkubationstemperatur von 37°C auf 32°C reduziert. Eine Absenkung der Temperatur auf 32-34°C erhöht den Retrovirustiter, zum einen durch die Erhöhung der Halbwertszeit der produzierten Viren und zum anderen durch eine gesteigerte Virusproduktion (Kotani *et al.*, 1994). Nach weiteren 24h wurde das virushaltige Medium von den 293 eFNX-Zellen abgenommen und durch 0.45 µm Filter gegeben, um zellfreie Virusüberstände zu präparieren. Die Lagerung der aufgereinigten Virusüberstände erfolgte bei -80°C. Die Virusüberstände wurden durch den Vorsatz „eco“ (für ecotrophe Verpackungszellen) vor dem Namen des verwendeten Merlin-Retrovirusvektor bezeichnet.

2.3.4 Infektion von PG13-Verpackungszellen mit ecotroph. Virusüberständen: stabile Produktion GALV-pseudotyp. Viren

Zur Produktion von Virusüberständen, mit denen die Zielzellen aus Ratte und Mensch infiziert wurden (GALV-Überstände), wurden subkonfluente PG13-Verpackungszellen dreimal mit den ecotrophen 293 eFNX-Überständen infiziert. Im einzelnen wurden die PG13-Verpackungszellen in 6well-Platten ausgesät und an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 1.5ml Virusüberstand und 5µg Protaminsulfat/ml Medium bei 37°C infiziert.

Einen Tag nach der beendeten Infektion wurden die Zellen auf 10cm-Kulturplatten expandiert. Die Sammlung der PG13-Virusüberstände begann, wenn die Zellen einen konfluenten Zellrasen ausbildeten und erfolgte alle 24h über vier Tage (Virusüberstand 1. bis 4. Sammlung). Die Zellen wurden während der Virusproduktion bei 32°C kultiviert und die Virusüberstände abschließend zur Aufreinigung filtriert (vgl. 2.3.3). Die Virusüberstände wurden analog zu den ecotrophen Überständen (2.3.3) durch den Vorsatz „pg“ (für PG13 Verpackungszellen) vor dem Namen des verwendeten Merlin-Retrovirusvektor bezeichnet.

Infizierte PG13-Verpackungszellen wurden für weitere Virusproduktionen bei -170°C eingefroren (DMEM, 5% FCS, 6% DMSO) und gelagert.

2.3.5 Infektion von 293 eFNX-Verpackungszellen mit PG13-Virusüberständen: stabile Produktion ecotropher Viren

Zur stabilen Produktion von ecotrophen Virusüberständen in 293 eFNX-Verpackungszellen wurden subkonfluente Zellen auf 10cm-Kulturplatten einmal mit 5ml der PG13-Virusüberstände infiziert. Die Infektion erfolgte für 18h unter Zusatz von 5µg/ml

Protaminphosphat. Nach abgeschlossener Infektion wurden die Zellen umgesetzt und nach Erreichen einer konfluenten Zelldichte bei 32°C kultiviert. Alle 24h wurde über einen Zeitraum von vier Tagen Virusüberstand (Virusüberstand 1. bis 4. Sammlung) abgenommen, filtriert (vgl. 2.3.3) und bei –80°C gelagert.

Infizierte 293 eFNX-Verpackungszellen wurden für weitere Virusproduktionen bei –170°C eingefroren (DMEM, 5% FCS, 6% DMSO) und gelagert.

2.3.6 Titration der Virusüberstände

Die Titer der erzeugten Virusüberstände („transduzierende Partikel/ml“) wurden über die Expression des Markerproteins EGFP infizierter humaner Fibroblasten (Marve SV40) ermittelt. Dazu wurden 16.000 Zellen pro *12well* ausgesät und nach 24h mit je 1ml verschiedener Verdünnungsstufen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) der Virusüberstände infiziert. 24h nach Infektion der Zellen in Gegenwart von 5µg Protaminsulfat/ml Medium, wurde das Medium gewechselt. Drei Tage nach Beendigung der Infektion wurde durch *fluorescence activated cell sorting (FACS)* der Anteil EGFP exprimierender Zellen an der Gesamtzahl der Zellen ermittelt. Die Titer wurden als Doppelwerte bestimmt.

Berechnung der Titer: $Y = X \times Z \div 100\%$

$Y \times \text{Verdünnung} = \text{Zahl der transduzierenden Partikel/ml}$

X: Zellzahl am Tag der Infektion = $2 \times$ ausgesäte Zellzahl (bei einem angenommenen Zellzyklus von 24h)

Y: Zahl der GFP-positiven Zellen

Z: % GFP in der FACS-Analyse

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von humanen Schwannzellen aus Schwannomen

NF2-Schwannzellen (NF2-SC) wurden aus subkutanen Schwannomen oder Hörnerv-Schwannomen gewonnen, die von NF2-Patienten der Neurochirurgie der Universität

Hamburg zur Verfügung gestellt wurden. Die Diagnose „Neurofibromatose 2“ wurde aufgrund von klinischen Kriterien gestellt, die auf der *NIH Consensus Conference on Neurofibromatosis* 1988 (erweitert nach Gutmann *et al.*, 1997c) definiert wurden.

Zur Genotypisierung der Patienten wurde zum einen aus DNA von Blutlymphozyten über SSCP (single-strand conformation polymorphism) die Keimbahnmutation im NF2-Gen festgestellt (Kluwe *et al.*, 1996). Zum anderen wurde mit DNA aus den Schwannomen eine LOH-Analyse (*loss of heterozygosity*, Verlust flankierender oder im NF2-Gen lokalisierter polymorpher Marker) durchgeführt, um die zweite NF2-Mutation zu ermitteln. Schwannome in denen keine Deletion nachweisbar war, wurden dann mittels SSCP auf Punktmutationen untersucht. Die Untersuchungen zum Genotyp wurden von L. Kluwe (Hamburg) durchgeführt.

Die erhaltenen Schwannome wurden zunächst von Fett und Bindegewebe freipräpariert, in ca. 5mm Stücke zerteilt und zwischen 1 bis 7 Tagen in DMEM mit 10% FCS, 500U/ml Penicillin/Streptomycin und 2 μ M Forskolin unter 10% CO₂ bei 37°C inkubiert. Forskolin wurde zur Stimulation der Schwannzell Proliferation zugegeben (Raff *et al.*, 1978). Nach dieser Präinkubation wurden die Tumorstücke weiter zerkleinert und mit 1.2 U/ml Dispase und 160U/ml Collagenase in DMEM/10% FCS für 24h proteolytisch verdaut. Mit Pasteurpipetten, deren Spitzen verengt wurden, wurden die Stücke sorgfältig trituiert und abschließend pelletiert (10min 1600rpm, Rotana/R, Hettich). Die Zellen wurden dann in Vollmedium aufgenommen und entweder weiter kultiviert oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4.2 Isolierung von humanen Schwannzellen aus Nervenbiopsien

Humane Schwannzellen wurden aus Nervenbiopsien von Multiorganspendern (MOS) des Transplantationszentrums Essen gewonnen. Die Nervenbiopsien wurden in ca. 1cm große Stücke zerkleinert, die Faszikel freipräpariert und 14 Tagen in DMEM mit 10%FCS, 500U/mlPenicillin-Streptomycin und 2 μ M Forskolin bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 10% präinkubiert. Danach wurden die Faszikel weiter zerkleinert (ca. 1mm Stücke) und in DMEM mit 10%FCS, 500U/mlPenicillin-Streptomycin und 160U/ml Kollagenase sowie 0.8U/ml Dispase 18h proteolytisch verdaut. Das Gewebe wurde dann wie unter 2.4.1 beschrieben trituiert, pelletiert und in Kultur genommen bzw. eingefroren.

2.4.3 Kultur primärer Schwannzellen

Die Kultivierung der NF2-SC und Kontroll-Schwannzellen (MOS) erfolgte bei 10% CO₂-Begasung und 37°C auf beschichteten Zellkulturplatten. Die Zellkulturplatten wurden zur Vorbeschichtung 30min bei RT mit 1mg/ml Poly-L-Lysin inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen, anschließend über Nacht mit 4µg/ml Maus-Laminin bei 4°C inkubiert und abschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die so beschichteten Platten konnten eine Woche bei 4°C gelagert werden. Schwannzellen wurden mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² in Vollmedium (vgl. 2.1.4) kultiviert. Das Zellkulturmedium, das rekombinanten Glia-Wachstumsfaktor (β1-Heregulin₁₇₇₋₂₄₄, Mark Slikowski, Genentech) zur Stimulation der Schwannzell Proliferation enthält (Levi *et al.*, 1995; Rutkowski *et al.*, 1995), wurde alle 3-4 Tage gegen frisch angesetztes Medium ausgewechselt und die Zellen bei erreichen konfluenten Zelldichten umgesetzt.

Für die Kultivierung primärer Ratten-Schwannzellen (10% CO₂-Begasung und 37°C) wurden Zellkulturplatten 30min bei RT mit 1mg/ml Poly-L-Lysin inkubiert und die beschichteten Platten anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Ratten-Schwannzellen wurden mit einer Dichte von 10.000-15.000 Zellen/cm² in Vollmedium (vgl. 2.1.4) kultiviert.

2.4.4 Kultur von Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (HeLa-, 293T-, NIH3T3-Zellen) wurden auf unbeschichteten Zellkulturplatten mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² (HeLa-Zellen) bzw. 30.000 Zellen/cm² (NIH3T3-Zellen) und einem CO₂-Gehalt von 5% bei 37°C kultiviert. Das Medium (vgl. 2.1.4) wurde zweimal wöchentlich gewechselt und die Zellen bei ca. 80% Konfluenz umgesetzt.

Die **Bestimmung von Zellzahlen** erfolgte durch Anfärbung der Zellen mit FDA (lebende Zellen fluoreszieren grün) oder Trypanblau (tote Zellen sind blau angefärbt) und Auszählung lebender Zellen in einer Neubauer-Zählkammer.

2.4.5 Transfektionen

Zur Überprüfung der Merlin-GFP-Konstrukte nach der Klonierung wurden die Retrovirusklone in 293T-Zellen transfiziert. Dazu wurden 2µg DNA mit 6µl Fugene™ 6 (Roche) nach Angaben

des Herstellers gemischt und über Nacht zu den Zellen gegeben. 48h nach der Transfektion wurde die GFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

2.4.6 Infektion der Zielzellen

NF2-Schwanzzellen wurden in 6well-Platten ausgesät und bei ca. 50% Konfluenz dreimal hintereinander für jeweils 24h und einer MOI von 5 (multiplicity of infection, Verhältnis: Anzahl Viruspartikel/Zellzahl) mit den verschiedenen PG13 Virusüberständen (LMIEG, LMEG, LEGM, LEG) infiziert. Den Virusüberständen wurden die für die Kultur von NF2-SC notwendigen Substanzen zugesetzt (0.5 μ M Forskolin, 10nM β 1-Heregulin₁₇₇₋₂₄₄, 0.5 mM IBMX und 2.5 μ g/ml Insulin), um eine Proliferation der NF2-Zellen im Virusüberstand zu ermöglichen. Alle Infektionen wurden mit 5 μ g/ml Protaminsulfat zur Steigerung der Transduktionseffizienz durchgeführt (Burns *et al.*, 1993). Protaminsulfat ist ein Polykation, das vermutlich durch Neutralisierung der negativen Ladungen von Retroviren und Zielzellen die Virus-Zell-Interaktion verbessert. Nach beendeter Infektion wurden die Zellen in Vollmedium inkubiert und bei Erreichen von Konfluenz umgesetzt.

Ratten-Schwanzzellen, HeLa- und 293 T-Zellen wurden für die Infektion mit einer Dichte von 8000 Zellen/cm² ausgesät und an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 18h mit den verschiedenen PG13 Virusüberständen (LMIEG, LMEG, LEGM, LEG; MOI 5) und 5 μ g/ml Protaminsulfat inkubiert.

NIH3T3-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen/cm² ausgesät und einmal mit den entsprechenden stabilen 293 eFNX-Virusüberständen infiziert (LMIEG, LMEG, LEGM, LEG). Die Infektion erfolgte für 18h unter Zusatz von 5 μ g/ml Protaminsulfat.

2.4.7 Bestimmung der Infektionseffizienz

Die Effizienz der Retrovirusinfektionen wurde über die Expression des Markerproteins EGFP ermittelt. Dazu wurden infizierte Zellen abtrypsiniert, einmal mit PBS gewaschen und zur Beurteilung der Zellviabilität in 5 μ g/ml Propidiumjodidlösung aufgenommen (ca. 100.000 Zellen in 200 μ l). Die Zellen wurden bis zur Messung am FACS-Calibur (Becton Dickinson) dunkel und auf Eis gelagert. Die Infektionseffizienz berechnete sich aus der Anzahl EGFP exprimierender Zellen an der Gesamtzahl lebender Zellen.

2.4.8 Einzelzellklonierung und FACS-Sortierung

Die infizierten Zelllinien (HeLa-, NIH3T3-Zellen) wurden über die GFP-Expression der Merlin/GFP-Konstrukte Einzelzell-kloniert bzw. durch eine FACS-vermittelte Sortierung selektioniert. Die resultierenden zu 100% Merlin-exprimierenden Zellen sollten die Detektion auch geringer Unterschiede zwischen Merlin-exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen ermöglichen.

Im einzelnen wurden **HeLa-Zellen** eines *6wells* abtrypsiniert und in verschiedenen sehr geringen Dichten (0.5%, 0.2%, 0.1% des abtrypsinierten Volumens) auf 10cm-Kulturplatten ausgesät. Nach 7-14 Tagen hatten sich auf den Platten vereinzelt liegende, ausreichend große Zellklone gebildet. Die Klone wurden einzeln mit je 20µl Trypsin abgelöst und in *48well*-Platten weiterkultiviert. Die GFP-Expression der Klone wurde im Inversmikroskop kontrolliert und positive Klone der jeweiligen Konstrukte vereint und weiter expandiert. Die FACS-Analyse der Klone ergab eine GFP-Expression von 96-100%.

GFP-positive **NIH3T3-Zellen** wurden über die Sortierapparatur eines FACS-Gerätes (Becton Dickinson) isoliert. Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert, mit einer Zelldichte von 10^6 /ml in DMEM aufgenommen und bis zum Sortiervorgang auf Eis gelagert. Nach Spülen des Gerätes mit sterilem PBS wurden grün fluoreszierende Zellen selektioniert und zur Vermeidung von Kontaminationen mit einem zusätzlichen Antibiotikum (5µl/ml Ciprobay, Bayer) weiter kultiviert. Ein Vorteil dieses automatischen Sortierens gegenüber der Einzelzellklonierung ist die Möglichkeit, nur besonders grüne, d.h. stark GFP-exprimierende - und damit auch stark Merlin-exprimierende - Zellen zu isolieren.

2.4.9 Zellproliferationsassay

Die Bestimmung der Proliferationsaktivität der verschiedenen Merlin-exprimierenden Kulturzellen erfolgte in der Regel über den Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU, Roche) als Thymidin-Analogon in die DNA replizierender Zellen. Eingebautes BrdU wurde mittels Immunfärbung mit einem FITC-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper (BrdU-AK, Pharmingen) und anschließender FACS-Analyse detektiert. Die Proliferationsrate von NIH3T3-Zellen wurde alternativ nach Propidiumjodid-Färbung über den DNA-Gehalt der Zellen bestimmt.

NF2-Schwanzzellen (subkonfluent) wurden 1-2 Tage nach dem Umsetzen mit 10µM BrdU inkubiert. Nach 72h wurden die Zellen abtrypsiniert, zweimal mit BSA gewaschen und 30min auf Eis in 70% Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen wurden dann für 15min mit 100µg/ml

RNase A behandelt und mit 2N HCl/0.5% Tx100 für 30min bei RT inkubiert. Die Salzsäure führt zur notwendigen Teil-Denaturierung der Doppelstrang-DNA, da BrdU-AK nur BrdU in Einzelstrang-DNA detektieren können. Anschließend wurde mit 0.1M Natriumtetraborat neutralisiert, mit 1% BSA/0.5% Tween 20 gewaschen und für 30min bei RT mit dem BrdU-AK inkubiert. Zur Beurteilung des Gesamt-DNA Gehaltes wurde mit 5µg/ml Propidiumjodid gegengefärbt.

Messung und Auswertung wurde am FACS-Calibur unter Verwendung des Programms Cell Quest (beides Becton Dickinson) durchgeführt

Die Proliferationsrate von **subkonfluenten HeLa-, NIH3T3- und 293T-Zellen** sowie **Ratten-Schwanzzellen** wurde durch Inkubation der Zellen mit 10µM BrdU für 2h einen Tag nach dem Umsetzen (Zelldichte 10.000/cm²) bestimmt. Immunfärbung und Auswertung erfolgte wie für NF2-SC beschrieben.

Zur Analyse der Proliferationsrate **konfluenten HeLa- und NIH3T3-Zellen** wurden die Zellen mit einer Dichte von 50.000 Zellen/cm² ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz (ca. 48h später) 5h mit 10µM BrdU inkubiert. Die Immunfärbung und Auswertung am FACS-Calibur erfolgte wie für NF2-SC beschrieben.

Alternativ wurden NIH3T3-Zellen nach einer 15minütigen Inkubation mit 100µg/ml RNase A bei 37°C mit 5µg/ml Propidiumjodid angefärbt und der DNA-Gehalt der Zellen mit dem FACS-Calibur unter Verwendung des Programms ModFit (Becton Dickinson) ausgewertet. Diese Methode basiert darauf, daß proliferierende Zellen einen DNA-Gehalt zwischen 1.0 (einfacher Chromosomensatz, G₀/ G₁-Zellen) und 2.0 (doppelter Chromosomensatz, G₂/M-Zellen) haben.

Die Proliferationsrate von **HeLa-Zellen nach Serumentzug** wurde ermittelt, indem 20.000 Zellen/cm² ausgesät und nach 48h (50-60% Konfluenz) für weitere 24h in Vollmedium mit 0.1% FCS kultiviert wurden. Nach Ablauf der 24h wurde für 5h in Vollmedium mit 10% FCS und 10µM BrdU inkubiert Die Immunfärbung und Auswertung erfolgte wie für NF2-SC beschrieben.

2.4.10 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Analysen wurden die Kulturzellen auf Kunststoffobjektträger mit Kammerung (LabTek™, Nalge Nunc International) ausgesät und frühestens nach 24h für

15min mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden dann mit 10% NGS/0.1% Triton X-100 präinkubiert und 1h mit dem in 2% NGS/0.1% Triton X-100 verdünnten Erstantikörper umgesetzt. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde entweder mit einem biotinylierten Zweitantikörper für 1h inkubiert, erneut dreimal gewaschen und 1h mit FITC-gekoppeltem Avidin inkubiert; oder es wurde 1h mit einem CY3-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und die Kerne für 1min mit DAPI-Lösung gegengefärbt.

Die verschiedenen Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen benutzt:

Kaninchen-anti-Merlin/N-term.-AK (Santa Cruz)	1:500
Kaninchen-anti-Merlin/C-term.-AK (Santa Cruz)	1:500
Kaninchen-anti-GFP-AK (Molekular Probes)	1:1000
Maus-anti-CD44-AK (Hermes-3, pers. Gabe Prof. Jalkanen)	1:8000
Ziege-anti-Kaninchen, Cy3 gekoppelt (Jackson Immuno)	1:1000
Maus-anti-BrdU, monoklonal, FITC gekoppelt (Pharmingen)	1:2
Ziege-anti-Kaninchen-AK, biotinyliert (Vector)	1:200
FITC-Avidin (Vector)	1:500

Phalloidinfärbungen des Zytoskeletts kultivierter Zellen wurden ebenfalls auf LabTeks™ durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 20min mit 4% PFA fixiert, 3 × mit PBS gewaschen, 5min in 0.2% Triton X-100/PBS permeabilisiert und wieder 3 × in PBS gewaschen. Danach wurde für 30min in 1% BSA/PBS blockiert und für 30min mit 1U/well (HeLa-Zellen) bzw. 5U/well (NF2-SC) FITC-Phalloidin bzw. Texas Red-Phalloidin inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und die Kerne für 1min mit DAPI-Lösung gegengefärbt.

2.4.11 Apoptose-Assay

Apoptotische Zellen wurden durch Fluoreszenzfärbung von DNA-Strangbrüchen detektiert (TUNEL-Methode, TdT-mediated dUTP nick end labeling). Im einzelnen wurden die Zellen 1h in 2% PFA fixiert, 3 × mit PBS gewaschen und 2min in 0.1% Triton X-100/0.1% Natriumzitat auf Eis permeabilisiert. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Zellen für 10min bei 37°C mit 7.5U DNase I (Pharmacia) in 10mM Tris/HCl pH 7.5 und 25mM MgCl₂ behandelt. Alle Zellen wurden dann für 1h bei 37°C mit 25U Terminaler Deoxynukleotid Transferase (Roche) und 0.3nM Tetramethylrhodamin- bzw. FITC-markiertem dUTP (Roche) in TdT-Puffer (Roche) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die Kerne

abschließend für 1min mit DAPI-Lösung gegengefärbt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch Auszählen der fluoreszierenden Zellen pro Blickfeld und der Berechnung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl.

Die für Molekularbiologie und Zellkultur verwendeten Reagenzien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von den Firmen SIGMA, Roche und Stratagene bezogen. Molekular- und zellbiologische Standardmethoden die nicht im Methodenteil aufgeführt werden, wurden nach Sambrook *et al.* (1989) und Spector *et al.* (1998) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klonierung der retroviralen Merlin- und Merlin/EGFP-Konstrukte

In der Zelle liegen zwei Merlin-Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen der prä-mRNA entstehen (siehe 1.2). Für die Klonierung der Merlin- und Merlin/EGFP-Retroviruskonstrukte wurde die cDNA der Merlin-Isoform I verwendet, da nur diese Isoform *in vivo* und *in vitro* einen Einfluss auf das Wachstum von Zellen hat (Shermann *et al.*, 1997; Gutmann *et al.*, 1998).

Die Merlin-cDNA wurde aus dem Vektor pBDNF2 (L. Kluwe) durch Restriktion mit dem Enzym Sma I isoliert und in den Vektor pBluescript umkloniert (pMerlin), um für alle weiteren notwendigen Klonierungsschritte eine größere Anzahl von Restriktionsschnittstellen aus der Multiklonierungsregion des pBluescript-Vektors zur Verfügung zu haben. Mit den unter 2.1.7 aufgeführten Primern wurde die Merlin-cDNA zur Überprüfung der Sequenz vollständig sequenziert. Nach dieser Validierung der korrekten Merlin-cDNA-Sequenz wurde pMerlin zur Klonierung der Merlin-cDNA in die Retrovirusvektoren MEG und MIEG (H. Hanenberg) benutzt. MEG und MIEG sind Derivate des Maus-Stammzellvirus MSCV 2.1 (Hawley *et al.*, 1994).

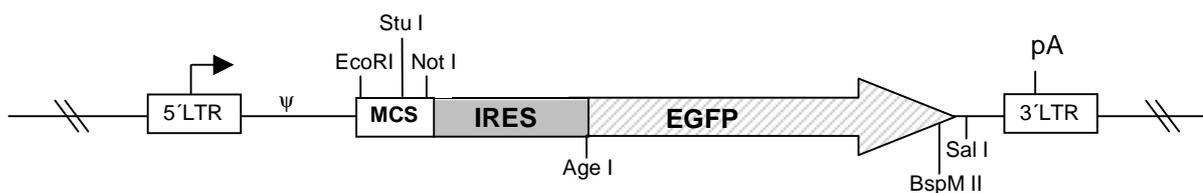


Abb. 4: Schematische Darstellung des Retrovirusvektor MIEG

Der Retrovirusvektor MEG unterscheidet von MIEG nur im Fehlen der internen Ribosomenbindestelle (IRES). LTR: MSCV2.1 lange terminale Wiederholungen, MCS: multiple Klonierungsstellen, EGFP: grünfluoreszierendes Protein, pA: Polyadenylierungsstelle, ψ : MSCV2.1 Verpackungssignal

Für die unterschiedlichen Fragestellungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden sollten, wurden insgesamt vier verschiedene Merlin-Retroviruskonstrukte hergestellt. Die Expression der Merlin- und Merlin-EGFP-Sequenzen wird in allen vier

Konstrukten durch Promotor- und Enhancerelemente im viralen LTR (lange terminale Wiederholungen) gesteuert. Die Bezeichnungen für die Merlin-EGFP-Retroviruskonstrukte setzt sich aus **L** für LTR-gesteuerte Expression, **M** für Merlin, **EG** für „enhanced“ GFP und **I** für IRES (interne Ribosomenbindestelle) zusammen.

Die Konstrukte **LM** (**LTR-Merlin**) und **LMIEG** (**LTR-Merlin-IRES-EGFP**) dienen der rekombinanten Expression der Wildtyp-Merlin-cDNA. Während das Konstrukt **LM** nur für die Merlin-cDNA kodiert, enthält **LMIEG** zusätzlich zu Merlin auch die cDNA Sequenz für EGFP, die durch eine interne Ribosomenbindestelle (IRES) getrennt von der Merlin Sequenz exprimiert wird. Diese Koexpression von Merlin und EGFP ermöglicht (i) eine einfache Detektion infizierter Zellen im Fluoreszenzmikroskop, (ii) die Bestimmung der Infektionseffizienz über eine durchflusszytometrische Analyse (FACS), (iii) sowie die Herstellung nahezu reiner rekombinanter Zellpopulationen. Aufgrund dieser Vorteile des Retrovirusvektors **LMIEG** gegenüber **LM** wurde im späteren Verlauf der Arbeit, vor allem bei Arbeiten mit dem nur begrenzt zur Verfügung stehenden humanen Zellmaterial, nur noch der Vektor **LMIEG** benutzt.

Insbesondere für die Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung des Merlin Proteins, wurden zwei zusätzliche Merlin-EGFP Fusionskonstrukte **LMEG** (**LTR-Merlin-EGFP**) und **LEGM** (**LTR-EGFP-Merlin**) verwendet, bei denen die EGFP-Kodierungssequenz entweder amino- (**LEGM**) oder carboxyl-terminal (**LMEG**) an die Merlinsequenz fusioniert wurde. Diese Fusionsproteine haben die bereits für das Konstrukt **LMIEG** erwähnten Vorteile und erlauben zudem eine durch die Merlinsequenz vermittelte intrazelluläre Verteilung des Fusionsproteins in verschiedenen Zellen durch die EGFP-Autofluoreszenz zu detektieren. Es war notwendig beide Fusionskonstrukte herzustellen, weil zum Zeitpunkt der Klonierungen nicht bekannt war, ob die Fusion von EGFP an den N- oder C-Terminus des Merlinproteins zu einer Beeinflussung von dessen Lokalisation und/oder Funktion führt.

Der Retrovirusvektor **MEG**, der nur die EGFP-Sequenz enthält, wurde als Kontrollvektor mitgeführt, um Merlin-unabhängige Beeinflussungen der Untersuchungsparameter detektieren zu können. Die Bezeichnung **MEG** leitet sich von **MSCV2.1**-Vektor und **EGFP** ab. Wegen einer einheitlichen Benennung der verwendeten Retrovirusvektoren und um eine mögliche Verwechslung mit dem Merlin-EGFP-kodierenden Vektor zu vermeiden wird der Ausgangsvektor **MEG** nachfolgend im Ergebnisteil (ab 3.2) mit **LEG** (**LTR-EGFP**) bezeichnet.

Der Retrovirusvektor **LM** (Abb. 5A) wurde durch Restriktion der Vektoren pMerlin und **MEG** mit den Enzymen Not I und Sal I generiert. Durch die Restriktion mit Not I und Sal I konnte

die EGFP Sequenz des MEG-Ausgangsvektors (siehe Abb. 4) entfernt und durch die Merlin-cDNA-Sequenz des Merlin-Klons ersetzt werden.

Für die Klonierung des Vektors **LMIEG** (Abb. 5B) wurde die Merlin-cDNA in den mit Stu I linearisierten Retrovirusvektor MIEG kloniert. Die Merlin-cDNA des Vektors pMerlin wurde mit dem Enzym Sma I isoliert und da beide Restriktionsenzyme glatte DNA Enden erzeugen, konnte die Merlin-cDNA direkt in den Retrovirusvektor einkloniert werden.

Zur Klonierung der beiden Merlin-EGFP-Fusionskonstrukte war es zum einen notwendig, die Merlin Sequenz so aus dem Ausgangsvektor pMerlin zu isolieren, dass der korrekte Leserahmen der Merlin-cDNA im Fusionsprotein erhalten blieb. Zum anderen musste die Ligation der Merlin-cDNA-Sequenz vor oder hinter die EGFP-Kodierungsregion zu einem durchgehenden Leserahmen führen. Im Fall des Fusionsproteins **LMEG** (Abb. 5C) wurde die Merlin-cDNA an das 5'-Ende der EGFP Sequenz ligiert. Um den Leserahmen der EGFP Sequenz bei der Restriktion des Vektors zu erhalten und die IRES Sequenz zu deletieren, wurde der Vektor MIEG mit den Enzymen EcoR I und Age I geschnitten (Abb. 4). Das Merlin-Fragment wurde durch eine PCR mit den Primern 3'Merlin/Age I und 5'Merlin/ATG (siehe 2.1.7) mit der pMerlin-DNA als Template generiert. Die Primer enthalten die Erkennungssequenzen für EcoR I bzw. Age I und waren so konzipiert, dass das entstehende PCR Produkt nach einer EcoR I und Age I Korestriktion *in frame* vor die EGFP Sequenz kloniert werden konnte.

Bei der Klonierung des zweiten Fusionsproteins **LEGM** (Abb. 5D), wurde die Reihenfolge von Merlin und EGFP im Konstrukt umgekehrt. Der Vektor pMerlin wurde daher mit dem Enzym Xma I geschnitten, dessen Erkennungssequenzen die Merlin-cDNA-Sequenz flankieren und dessen 5'-Erkennungssequenz sich *in frame* kurz vor dem Merlin Startcodon befindet. Der Retrovirusvektor MEG wurde durch das Enzym BspM II unmittelbar am 3'-Ende der EGFP Sequenz linearisiert und das Xma I-geschnittene Merlin-Fragment wurde an den EGFP Leserahmen ligiert. Xma I und BspM II erzeugen kompatible DNA Enden.

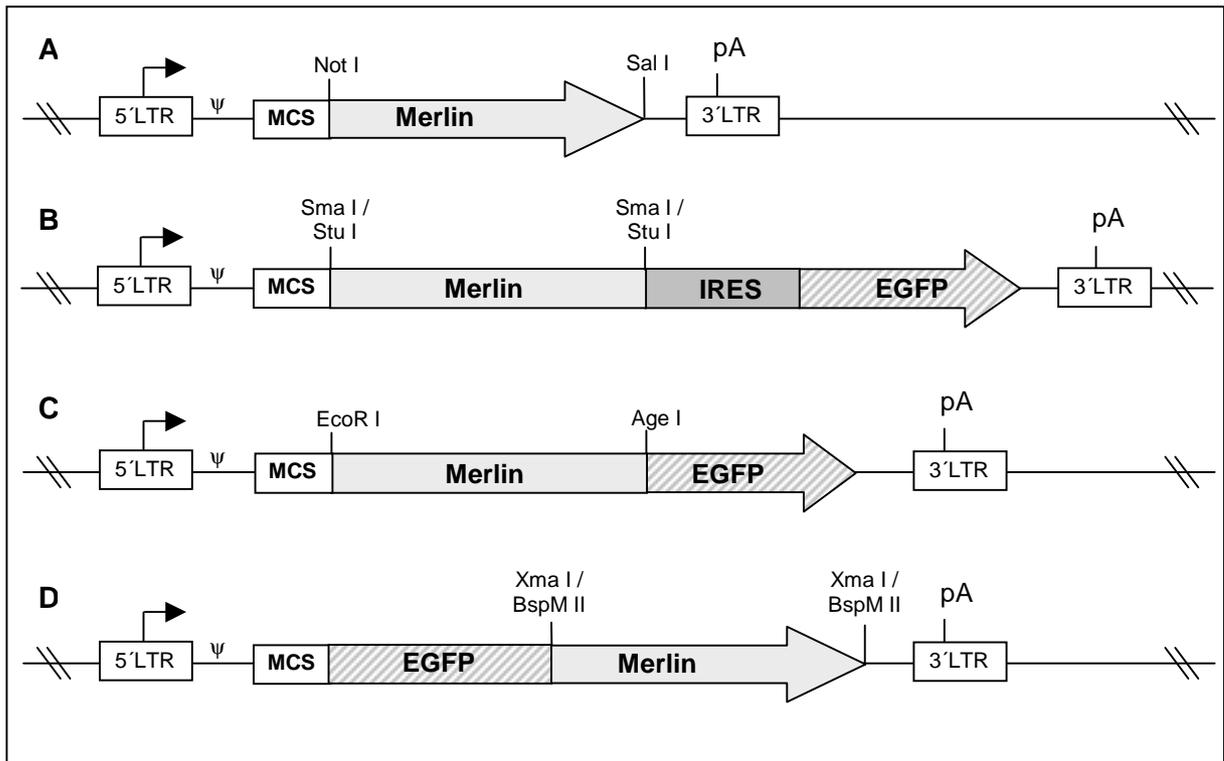


Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Merlin- und Merlin/EGFP-Konstrukte (A) LM, (B) LMIEG, (C) LMEG, (D) LEGM. Die Konstrukte sind nicht maßstabsgerecht gezeichnet.

Vor der Herstellung von rekombinanten Retrovirusüberständen wurden zur Überprüfung alle Klonierungsstellen der verschiedenen Merlin Retroviruskonstrukte sowie die gesamte mittels PCR generierte Merlin-cDNA-Sequenz des LMEG-Konstruktes sequenziert.

Die Retroviruskonstrukte wurden dann in HeLa- und 293 T-Zellen transfiziert (2.4.5), um die Funktionsfähigkeit der generierten Merlin-EGFP-Retrovirusvektoren zu überprüfen. Das geschah zum einen über den Nachweis von nativem GFP in den transfizierten Zellen und zum anderen über eine Immunfärbung mit einem Merlin-Antikörper (2.1.6).

3.2 Titration der rekombinanten GALV-pseudotypisierten Retrovirusüberstände

Zur Bestimmung der Titer (transduzierende Partikel pro Milliliter, TU/ml) der rekombinanten GALV-pseudotypisierten Retrovirusüberstände pgLMIEG, pgLMEG, pgLEGM und pgLEG wurden humane Fibroblasten (Marve SV40) je zweimal mit den einzelnen Virusüberständen

(1.-4. Sammlung) von drei unabhängigen Virusproduktionen infiziert. Nach 72h wurde der Anteil EGFP exprimierender Zellen an der Gesamtzahl der Zellen mittels FACS Analyse bestimmt und daraus der Titer der verschiedenen Virusüberstände berechnet.

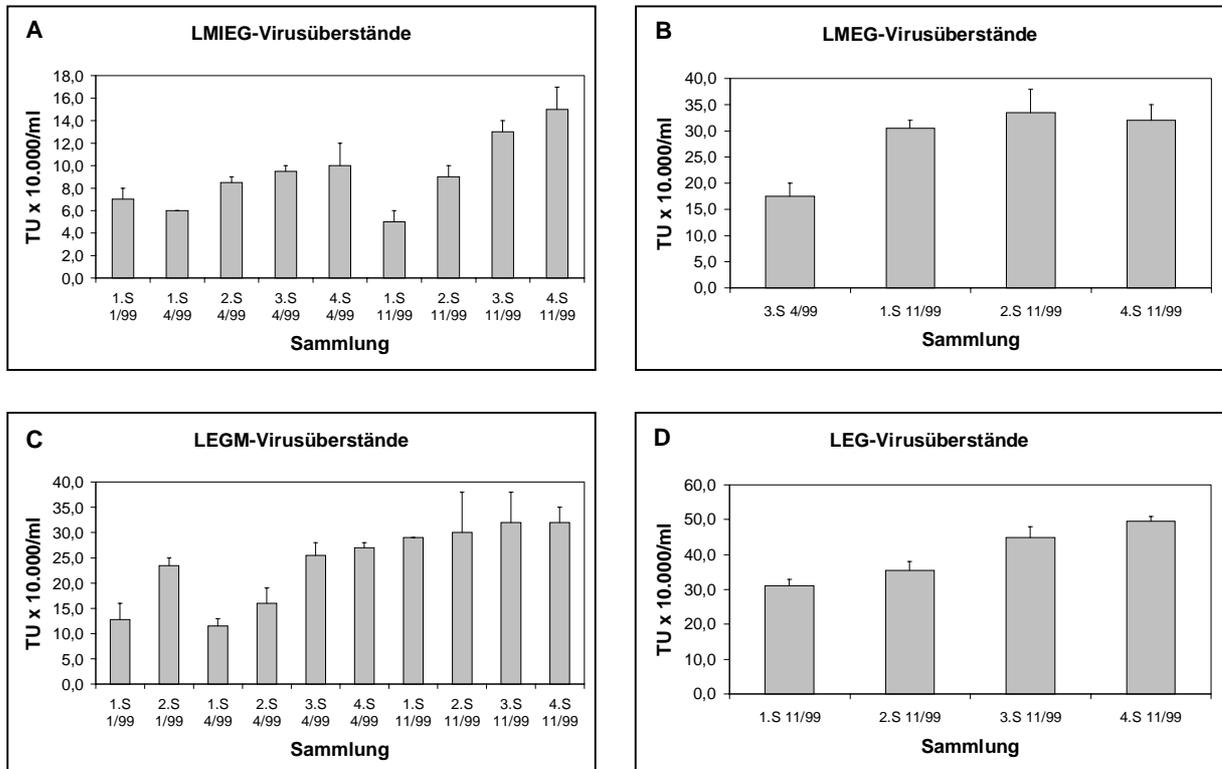


Abb. 6: Ergebnisse der Titration der Retrovirusüberstände

Die Abbildungen zeigen die Titrationsergebnisse der pgLMIEG- (A), pgLMEG- (B), pgLEGM- (C) und pgLEG- (D) Virusüberstände. Titriert wurden verschiedene Sammlungen (1.-4.S) von bis zu drei unabhängigen Virusproduktionen (1/99, 4/99, 11/99). Der Titer ist angegeben als „transduzierende Partikel pro ml Virusüberstand“ (TU/ml). Fehlerbalken repräsentieren die Abweichung der Ergebnisse von zwei unabhängigen Titrationen pro Sammlung vom Mittelwert.

Die Titer der rekombinanten Virusüberstände variierten zwischen $0.5-1.5 \times 10^6$ TU/ml (pgLMIEG), $1.8-3.4 \times 10^6$ TU/ml (pgLMEG), $1.2-3.2 \times 10^6$ TU/ml (pgLEGM) und $3.1-5.0 \times 10^6$ TU/ml (pgLEG) und zeigten i.a. den erwarteten Anstieg des Titers von der ersten zur vierten Sammlung eines Virusüberstandes. Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Virusüberständen ergab, dass das nur EGFP exprimierende Kontrollvirus pgLEG in jeder Sammlung den höchsten Titer hatte. Die beiden Merlin-EGFP-Fusionsproteine exprimierenden Viren pgLMEG und pgLEGM hatten etwa gleich hohe Titer, das Merlin und EGFP getrennt exprimierende Virus pgLMIEG wies die niedrigsten Werte auf.

Für die Infektion von NF2-Schwanzzellen wurden wegen des höchsten Titers nur die Virusüberstände der 4. Sammlung von November '99 benutzt.

Der Titer des Virusüberstandes pgLM, der bei den ersten Experimenten mit verschiedenen Zelllinien zusätzlich benutzt wurde, konnte aufgrund der fehlenden EGFP-Expression mit der hier verwendeten Methode nicht bestimmt werden.

3.3 Infektion von Zelllinien und Ratten-Schwanzzellen

Mehrere Versuche an verschiedenen Zelllinien und kultivierten primären Ratten-Schwanzzellen dienten nach der Produktion der rekombinanten Virusüberstände zur Überprüfung der Hypothese, dass die Überexpression von Merlin in verschiedenen Kulturzellen zu einer Absenkung der Proliferationsrate führt (Lutchman und Rouleau, 1995; Sherman *et al.* 1997).

Primäre Ratten-Schwanzzellen der 5. Passage und **HeLa-Zellen** wurden an drei aufeinander folgenden Tagen mit den Virusüberständen pgLMIEG, pgLMEG, pgLEGM, pgLEG und pgLM für 4h (SC) bzw. 18h (HeLa) infiziert (MOI 5, multiplicity of infection, Verhältnis: Anzahl Viruspartikel/Zellzahl). Die Infektionszeit von Ratten-Schwanzzellen wurde auf 4h begrenzt, da Ratten-SC bei längeren Inkubationen in Medium ohne Forskolin-Zusatz geringer proliferieren.

Für die Infektion von **293 T-Zellen** wurden auch die oben genannten Virusüberstände verwendet (MOI 5). Die 293 T-Zellen wurden aber aufgrund der bekannt hohen Infektionsrate dieser Zellen nur einmal über einen Zeitraum von 18h infiziert.

NIH3T3-Zellen wurden ebenfalls für 18h, aber mit den ecotrophen Virusüberständen ecoLM, ecoLMIEG, ecoLMEG, ecoLEGM und ecoLEG infiziert. Die Titer der ecotrophen Virusüberstände wurden für diese Experimente nicht exakt bestimmt.

3.3.1 Effizienz der Infektion von Zelllinien und primären Ratten-Schwanzzellen

Zur Bestimmung der Effizienz der Retrovirus-Infektionen wurde die Expression des Markerproteins EGFP in infizierten Zellen untersucht (FACS-Analyse) und der Anteil der EGFP exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation berechnet. Die Analyse wurde 2 Tage (NIH3T3-, HeLa- und 293 T-Zellen) und 5 Tage (Ratten-SC) nach beendeter Infektion durchgeführt. Zusätzlich wurden die infizierten HeLa-Zellen nach 16 Tagen erneut

hinsichtlich ihrer EGFP-Expression analysiert, um den Zeitverlauf bzw. die Konstanz der EGFP-Expression zu untersuchen.

EGFP exprimierende Zellen					
Virus	Ratten-SC	HeLa-Zellen	HeLa-Zellen	NIH3T3-Zellen	293 T-Zellen
LMIEG	15%	64%	61%	47%	20%
LMEG	29%	80%	80%	74%	64%
LEGM	33%	74%	77%	76%	49%
LEG	54%	89%	74%	83%	91%
Tage nach Infektion	5	2	16	2	2

Tab. 1: Übersicht über die Infektionseffizienzen (Anteil EGFP-exprimierender Zellen) von Ratten-Schwanzzellen und verschiedenen Zelllinien

In der Tabelle 1 sind die ermittelten Infektionseffizienzen von Ratten-Schwanzzellen und den verschiedenen untersuchten Zelllinien aufgeführt. Primäre Zellen sind aufgrund der i.a. geringeren Proliferationsrate schlechter mit Retroviren zu infizieren, was sich auch hier in den unterschiedlichen Infektionseffizienzen von primären Ratten-Schwanzzellen und HeLa-, NIH3T3- sowie 293 T-Zellen widerspiegelt. Der Prozentsatz EGFP-exprimierender HeLa-Zellen ist wie erwartet 2 und 16 Tage nach der Infektion gleich hoch.

3.3.2 PCR-Nachweis integrierter Proviren im Genom infizierter HeLa-Zellen

Der Nachweis einer stabilen Infektion mit andauernder Expression der rekombinanten Proteine in den infizierten Zellen erfolgte in erster Linie durch wiederholte mikroskopische Kontrolle bzw. FACS-Analyse der Fluoreszenz des Markerproteins EGFP zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. Darüber hinaus wurde an HeLa-Zellen exemplarisch etwa 10 Passagen nach erfolgter Infektion die Integration der rekombinanten Proviren in das Genom der Zellen durch eine PCR-Analyse überprüft. Dabei wurden in den einzelnen Ansätzen die Primerpaare so gewählt, dass sich jeweils die eine Primerbindestelle in der Merlinsequenz und die andere in der Vektorsequenz (EGFP-, IRES- oder 3'LTR-Sequenz) befand. PCR-

Produkte sollten demnach nur entstehen, wenn der entsprechende rekombinante Provirus im Genom integriert war. Im Ansatz zum Nachweis des LM-Provirus wurden zwei Merlin-spezifische Primer verwendet, die aber wegen ihrer Lage bezüglich der Exon-Intron Struktur des Merlin-Gens zu keinem PCR-Produkt auf Grundlage der endogenen Merlin-Sequenz führen konnten.

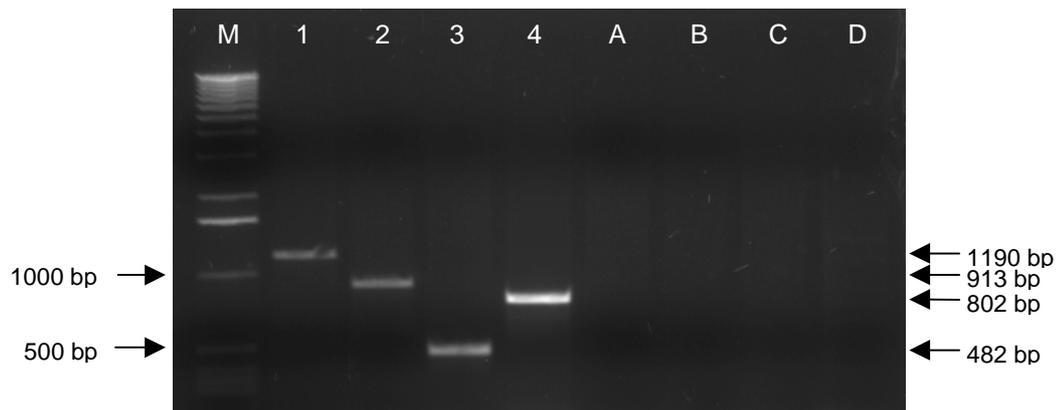


Abb. 7: PCR-Nachweis integrierter Proviren im Genom von infizierten HeLa-Zellen

Die PCR-Reaktionen wurden mit 1 µg genomischer DNA aus HeLa-Zellen und den Primern Merlin-intern-P1/Merlin-intern-P8 (LM, Spur 1), Merlin-intern-P5/3' IRES2 (LMIEG, Spur 2), Merlin-intern-7P/3' MEG/MIEG3 (LMEG, Spur 3) und Merlin-intern-P4/5' MEG/MIEG2 (LEGM, Spur 4) durchgeführt. In den Spuren A-D sind Aliquots der identischen Kontrollreaktionen aufgetragen, die mit DNA aus uninfizierten HeLa-Zellen durchgeführt wurden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 1%igen Agarosegel. M: Molekulargewichtsmarker 1Kb-Leiter

In infizierten HeLa-Zellen konnte erwartungsgemäß die stabile Integration aller rekombinanter Virussequenzen 10 Wochen nach der Infektion nachgewiesen werden (Abb. 7, Spur 1-4). Die beobachteten PCR-Fragmente bei 1190 bp (LM, Spur 1), 913 bp (LMIEG, Spur 2), 482 bp (LEGM, Spur 3) und 802 bp (LMEG, Spur 4) stellen die verschiedenen PCR-Produkte mit der erwarteten Größe dar, die nur in den PCR-Reaktionen mit den infizierten Zellen entstanden. In identischen Kontrollreaktionen die mit DNA aus uninfizierten HeLa-Zellen durchgeführt wurden (Spur A-D), konnte kein PCR-Produkt detektiert werden.

Der Nachweis stabiler Integration der Proviren bzw. die andauernde Expression der rekombinanten Proteine erfolgte für alle weiteren infizierten Zellen durch regelmäßige mikroskopische Kontrolle bzw. durch FACS-Analyse der Fluoreszenz des Markerproteins EGFP.

3.3.3 Proliferationsdaten von Zelllinien und Ratten-Schwanzzellen nach Überexpression von Merlin

Die Zellzyklusdaten der Kulturzellen wurden nach Immunfärbung mit einem FITC-gekoppelten BrdU-Antikörper und anschließender DNA-Färbung mit Propidiumjodid mittels FACS-Analyse erhoben. Die Auswertung erfolgte durch zweidimensionale Darstellung des DNA-Gehaltes (X-Achse, PI-Fluoreszenz) und des BrdU-Einbaus (Y-Achse, FITC-Fluoreszenz) in den untersuchten Zellen. Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklusses befanden, wurden durch das FITC-Signal des eingebauten BrdU und den zunehmenden DNA-Gehalt einwandfrei detektiert (Abb. 8, Region 3)

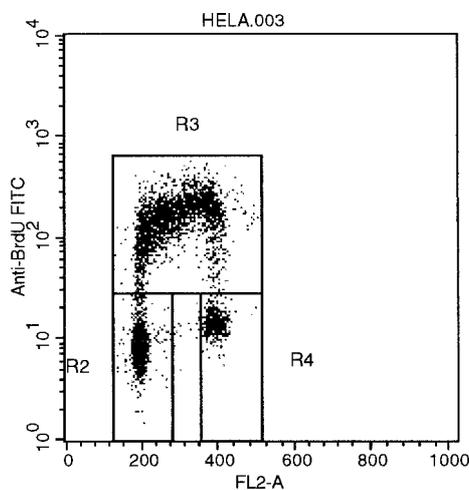


Abb. 8: Durchflusszytometrische Auswertung des Zellzyklus

Zweidimensionale Darstellung von DNA-Gehalt (X-Achse, PI-Fluoreszenz) und BrdU-Einbau (Y-Achse, FITC-Fluoreszenz) in infizierten HeLa-Zellen nach 5h BrdU-Puls. R2: G₀/ G₁-Zellen, einfacher DNA-Gehalt; R3: S-Phase-Zellen, zunehmender DNA-Gehalt, FITC-Signal; R4: G₂/M-Zellen, doppelter DNA-Gehalt.

Zur Analyse der Proliferation nach Überexpression von Wildtyp-Merlin, wurden Ratten-Schwanzzellen 5 Tage, sowie NIH3T3- und 293 T-Zellen 3 Tage nach der Infektion für 2h mit 10µM BrdU inkubiert. HeLa-Zellen wurden 3, 5 und 24 Tage nach der Infektion ebenfalls für 2h mit 10µM BrdU inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen mit Hilfe der FACS-Analyse ausgewertet.

Zur besseren Übersicht ist in den folgenden Tabellen nur der Anteil an Zellen aufgeführt, der sich zur Zeit der BrdU-Inkubation in der S-Phase des Zellzyklusses befand:

A			
% Zellen in der S-Phase			
Virus-konstrukt	HeLa-Zellen I	HeLa-Zellen II	HeLa-Zellen III
uninf. Zellen	48.7	31.9	41.6
LM	49.6	32.4	42.1
LMIEG	47.7	33.2	43.4
LMEG	49.0	33.3	42.3
LEGM	48.5	31.2	45.2
LEG	47.3	31.6	40.7
Tage nach Infektion	3	5	24

B				
% Zellen in der S-Phase				
Virus-konstrukt	Ratten-SC	NIH3T3-Zellen I	NIH3T3-Zellen II	293 T- Zellen
uninf. Zellen	32.0	29.5	31.2	59.7
LM	30.3	32.3	35.2	57.6
LMIEG	31.0	33.0	34.7	59.1
LMEG	33.0	29.9	33.7	60.8
LEGM	32.9	34.9	35.4	59.2
LEG	31.0	34.7	34.9	58.8
Tage nach Infektion	5	3	3	3

Tab 2A und B: Prozentsatz proliferierender Zellen (% S-Phase) nach Merlin Überexpression

HeLa-Zellen (A) sowie Ratten-Schwanzzellen, NIH3T3- und 293T-Zellen (B) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit BrdU inkubiert und der Anteil der Zellen an den verschiedenen Zellzyklusstadien wurde durch eine durchflusszytometrische Auswertung bestimmt. Die Proliferationsraten der HeLa-Zellen wurde dreimal (I-III), die der NIH3T3-Zellen zweimal (I-II) unabhängig voneinander bestimmt.

Die Proliferationsraten (Anteil Zellen in der S-Phase des Zellzyklus bezogen auf die Gesamtzellzahl) der verschiedenen Merlin überexprimierenden Zelllinien sowie der primären Ratten-Schwanzzellen zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber uninfizierten oder

mit dem LEG-Kontrollvirus infizierten Zellen. Auch eine längerfristige rekombinante Expression von Merlin in HeLa-Zellen (Tab. 2A, Messung III, 24 Tage) hatte keinen Effekt auf die Proliferationsrate der infizierten Zellen. Die stabile Überexpression des rekombinanten Merlinproteins in diesen Zellen war durch eine ergänzende FACS-Analyse 16 Tage nach der Infektion (3.3.1, Tab. 1) überprüft worden.

3.4 Charakterisierung von stabil Merlin überexprimierenden HeLa- und NIH3T3- Zellen *in vitro*

Da die Überexpression von Merlin in primären Ratten-Schwanzzellen und verschiedenen getesteten Zelllinien (3.3.3) unter den gewählten Bedingungen keinen sichtbaren Effekt auf die Proliferation hatte, wurden von den bereits infizierten kultivierten NIH3T3- und HeLa-Zellen (3.3) über die Sortierapparatur eines FACS-Gerätes (Becton Dickinson) bzw. durch Einzelzellklonierung angereicherte Zellpopulationen separiert, die stabil EGFP und Merlin exprimieren. Mit Hilfe dieser Zellpopulationen (NIH3T3-LM, -LMIEG, -LMEG, -LEGM, -LEG bzw. HeLa-LM, -LMIEG, -LMEG, -LEGM, -LEG) war es möglich, auch geringe Auswirkungen der Merlin-Überexpression auf das Proliferationsverhalten dieser Zellen zu detektieren. Um den Einfluß äußerer Parameter zu testen, die die Proliferation beeinflussen können, wurde zusätzlich die Zelldichte zum Zeitpunkt der Proliferationsbestimmung variiert und es wurden darüber hinaus Proliferationsanalysen mit HeLa-Zellen nach Serumentzug durchgeführt.

3.4.1 Analyse Merlin überexprimierender HeLa-Zellen

3.4.1.1 Proliferationsanalyse

Da in bestimmten Zelllinien unter **konfluenten Kulturbedingungen** eine proliferations-senkende Funktion von Merlin beschrieben war (Lutchman und Rouleau, 1995), wurden zur Analyse des Proliferationsverhaltens von Merlin überexprimierenden Zellen die einzelzellklonierten HeLa-Zellen mit einer Zelldichte von 50.000 Zellen/cm² ausgesät. Nach dem Ausbilden eines konfluenten Zellrasens (ca. 48h später) wurden die Zellen für 5h mit 10µM BrdU inkubiert und die Zellzyklusphasen wurden nach der Immunfärbung mit einem FITC-gekoppelten BrdU-Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt. Die Daten wurden in zwei Serien mit je drei unabhängigen Experimenten in den einzelnen Zellpopulationen

erhoben. In der ersten Serie hatten die Kulturen eine Zelldichte von ca. 95%, in der zweiten Serie von ca. 85%.

In der Tabelle 3 sind die Proliferationsdaten der drei unabhängigen Messungen bei 95% Konfluenz aufgeführt (Serie I). Ein Vergleich der mit unterschiedlichen Konstrukten infizierten Zellen zeigt, dass Merlin überexprimierende HeLa-Zellen unter konfluenten Zellkulturbedingungen eine gesteigerte Proliferationsrate sowohl gegenüber uninfizierten Zellen, als auch gegenüber mit dem Kontrollvirus infizierten Zellen aufweisen. Uninfizierte Zellen und infizierte Kontrollzellen zeigen eine durchschnittliche Proliferationsrate von 25.2% bzw. 24.5%, während die Merlin überexprimierenden Zellen mit einer Rate von durchschnittlich 34.8%, 30.1% und 37.0% proliferierten. Setzt man die Proliferationsrate der uninfizierten Kontrollzellen gleich 100%, so ergibt sich für die Merlin überexprimierenden Zellen eine Proliferationssteigerung auf 119 bis 147% (Abb. 9). Kontrollzellen, die mit dem EGFP exprimierenden Virus infiziert wurden, unterscheiden sich in der Proliferationsstärke hingegen nicht signifikant von den uninfizierten Zellen.

HeLa-Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase	p
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M		
uninf. Zellen	72.1	24.8	2.5	25.2	
	71.2	26.0	2.4		
	72.0	24.8	2.7		
LMIEG	61.7	34.4	3.5	34.8	<0.05
	61.1	35.2	3.2		
	60.9	35.0	3.7		
LMEG	65.2	30.7	3.7	30.1	<0.05
	65.9	29.6	3.8		
	66.1	30.0	3.5		
LEGM	59.2	37.2	3.0	37.0	<0.05
	57.5	38.4	3.6		
	60.9	35.4	3.1		
LEG	71.3	25.5	2.7	24.5	
	72.3	24.9	2.4		
	74.0	23.1	2.5		

Tab. 3: Zellzyklusdaten konfluenter HeLa-Zellen (Serie I)

Verteilung der Zellzyklusphasen infizierter und uninfizierter HeLa-Zellen bei ca. 95% Konfluenz. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 50.000 Zellen/cm² ausgesät und nach ca. 48h analysiert. p<0.05 (*Student's t Test*).

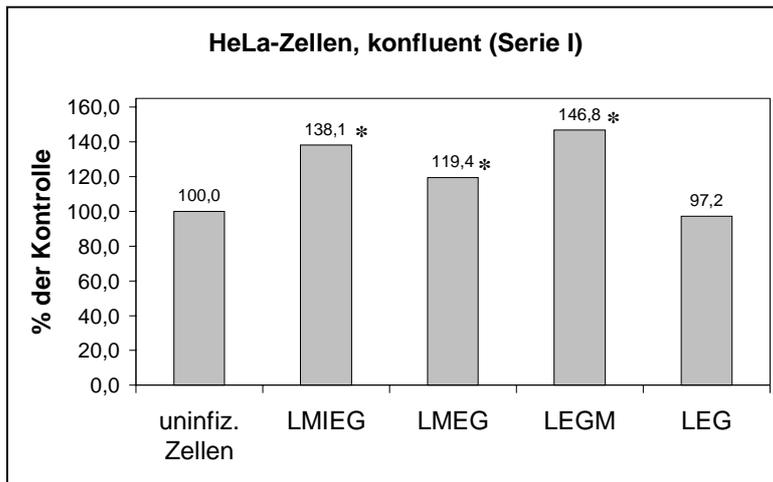


Abb. 9: Proliferationssteigerung konfluenter HeLa-Zellen (Serie I)

Prozentuale Steigerung der Proliferationsrate der zu ca. 95% konfluenter HeLa-Zellen bezogen auf den auf 100% gesetzten Anteil der uninfizierten Zellen in der S-Phase. * $p < 0.05$ (*Student's t Test*), $n=3$.

Die Daten einer zweiten unabhängigen Serie von Kontrollmessungen an HeLa-Zellen mit einer Zelldichte von etwa 85% Konfluenz bestätigten die vorangegangenen Ergebnisse (Tab. 4). Auch in diesem Experiment war eine deutliche Proliferationssteigerung der Merlin überexprimierenden Zellen auf 117 bis 136% gegenüber den Kontrollzellen zu beobachten (Abb. 10). Als Kontrollproben dienten in diesen Fall die mit dem EGFP exprimierenden Virus infizierten Zellen.

HeLa-Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase	p
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M		
LMIEG	49.3	46.1	4.4	46.0	< 0.05
	49.4	46.0	4.4		
	49.6	46.0	4.3		
LMEG	55.7	41.8	2.3	42.1	< 0.05
	56.0	41.6	2.3		
	54.5	42.8	2.3		
LEGM	48.8	48.5	2.5	48.8	< 0.05
	49.7	47.6	2.3		
	47.2	50.1	2.5		
LEG	61.0	36.2	2.7	36.0	
	60.6	36.3	2.5		
	61.7	35.4	2.7		

Tab. 4: Zellzyklusdaten konfluenter HeLa-Zellen (Serie II)

Verteilung der Zellzyklusphasen infizierter und uninfizierter HeLa-Zellen bei ca. 85% Konfluenz. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 50.000 Zellen/cm² ausgesät und nach ca. 48h analysiert. Uninfizierte Kontrollzellen wurden nicht mitgeführt. $p < 0.05$ (*Student's t Test*).

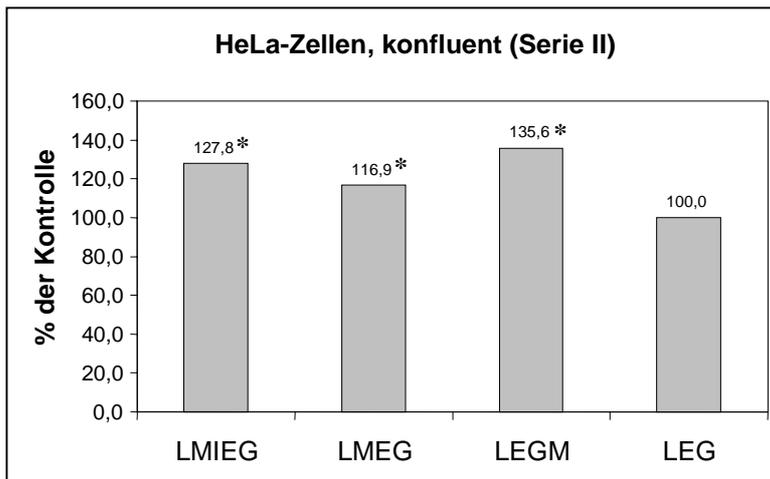


Abb. 10: Proliferationssteigerung konfluenter HeLa-Zellen (Serie II)

Prozentuale Steigerung der Proliferationsrate der zu ca. 85% konfluenter HeLa-Zellen bezogen auf den auf 100% gesetzten Anteil der infizierten Kontrollzellen (LEG) in der S-Phase. * $p < 0.05$ (Student's *t* Test), $n=3$.

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Merlin überexprimierenden HeLa-Zellen beruhte auf der Beobachtung, dass die Expression des endogenen Merlinproteins in verschiedenen Zelllinien (z.B. NIH3T3-Zellen und Ratten-Fibroblasten) nach **Serumentzug** ansteigt (Shaw *et al.* 1998a). Um den Effekt von Serumentzug auf die einzelzellklonierten HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden subkonfluente Kulturen 24h in Medium mit einem FCS-Gehalt von nur 0.1% kultiviert und anschließend für 5h mit 10 μ M BrdU inkubiert (Zoidl *et al.*, 1997). Die Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte wie oben für konfluente HeLa-Zellkulturen beschrieben. Die Daten wurden erneut in zwei Serien mit je drei unabhängigen Experimenten in den mit den verschiedenen Konstrukten infizierten Zellpopulationen erhoben.

Tabelle 5 gibt die Verteilung der verschiedenen Zellzyklusphasen in den infizierten und uninfizierten HeLa-Zellkulturen nach Serumentzug wieder (Serie I). Wie auch bei den Analysen konfluenter HeLa-Zellkulturen ist die Proliferation in Merlin-infizierten Zellen gegenüber uninfizierten Zellen oder mit dem Kontrollvirus infizierten Zellen deutlich erhöht. Die durchschnittliche Proliferationsrate der Zellen, die kein rekombinantes Merlinprotein exprimieren liegt bei etwa 30%. Merlin überexprimierende Zellen hingegen zeigen eine Proliferationsrate von durchschnittlich 35 bis 42%, was einer Proliferationssteigerung auf 117 bis 142% der Kontrollzellen entspricht (Abb. 11). Die mit dem LEG-Kontrollvirus infizierten Zellen unterscheiden sich in ihrem Proliferationsverhalten nicht von den uninfizierten Zellen.

HeLa-Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase	p
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M		
uninf. Zellen	61.6	27.0	9.7	29.7	
	59.2	30.8	8.6		
	58.3	31.3	9.5		
LMIEG	49.5	41.8	8.5	41.4	<0.05
	49.1	41.0	9.1		
	49.1	41.4	9.1		
LMEG	52.8	37.0	9.4	34.6	<0.05
	53.0	33.9	10.8		
	53.8	32.8	11.0		
LEGM	47.7	43.7	8.2	42.3	<0.05
	49.0	41.0	9.4		
	48.9	42.1	8.5		
LEG	59.4	31.5	8.4	29.8	
	61.3	29.9	7.9		
	63.0	28.0	8.1		

Tab. 5: Zellzyklusdaten von HeLa-Zellen nach Serumentzug (Serie I)

Verteilung der Zellzyklusphasen subkonfluenter infizierter und uninfizierter HeLa-Zellen nach 24stündiger Kultivierung bei einem FCS-Gehalt von 0.1%. $p < 0.05$ (*Student's t Test*).

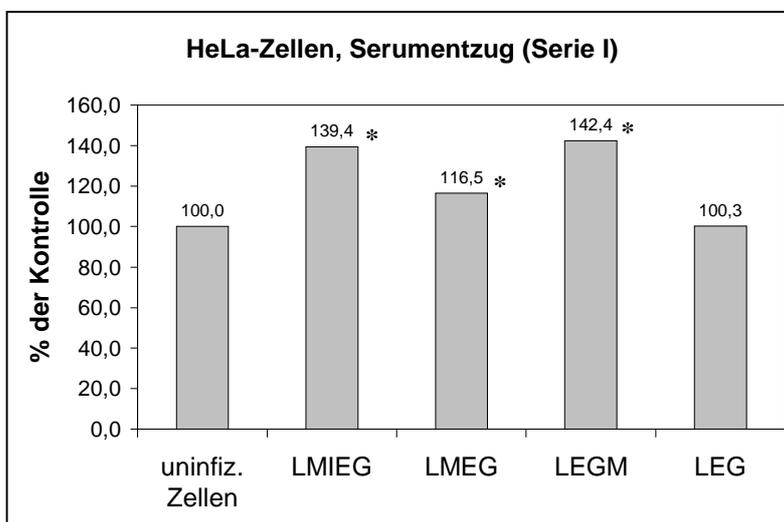


Abb. 11: Proliferationssteigerung von HeLa-Zellen nach Serumentzug (Serie I)

Prozentuale Steigerung der Proliferationsrate von HeLa-Zellen nach Serumentzug für 24h bezogen auf den auf 100% gesetzten Anteil der infizierten Kontrollzellen in der S-Phase. $*p < 0.05$ (*Student's t Test*), $n=3$.

Die Daten der unabhängigen Kontrollmessungen (Serie II) sind in Tabelle 6 aufgeführt. Wie in der vorangegangenen Messung konnte eine deutliche Proliferationssteigerung der Merlin überexprimierenden Zellen nach Serumentzug beobachtet werden. Die Erhöhung des Anteils

der Zellen in der S-Phase von 39% (uninfizierte Zellen) auf 45-51% (Merlin überexprimierende Zellen) entspricht einer Proliferationssteigerung auf 116-131% (Abb. 12). Die mit dem EGFP-Konstrukt infizierten Kontrollzellen proliferieren hingegen nicht verstärkt.

HeLa-Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase	p
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M		
uninf. Zellen	51.8	38.0	9.0	39.0	
	51.2	40.1	8.2		
	53.2	38.9	7.7		
LMIEG	42.8	48.4	8.3	47.6	<0.05
	43.4	47.7	8.5		
	44.2	46.6	8.7		
LMEG	46.3	45.7	7.8	45.4	<0.05
	46.5	45.1	8.2		
	46.4	45.5	8.0		
LEGM	42.1	51.5	6.2	50.9	<0.05
	43.0	50.0	6.8		
	42.0	51.3	6.4		
LEG	54.7	37.7	7.4	36.0	
	58.4	34.5	6.9		
	57.2	35.9	6.5		

Tab. 6: Zellzyklusdaten von HeLa-Zellen nach Serumentzug (Serie II)

Verteilung der Zellzyklusphasen subkonfluenter infizierter und uninfizierter HeLa-Zellen nach 24stündiger Kultivierung bei einem FCS-Gehalt von 0.1%. $p < 0.05$ (*Student's t Test*).

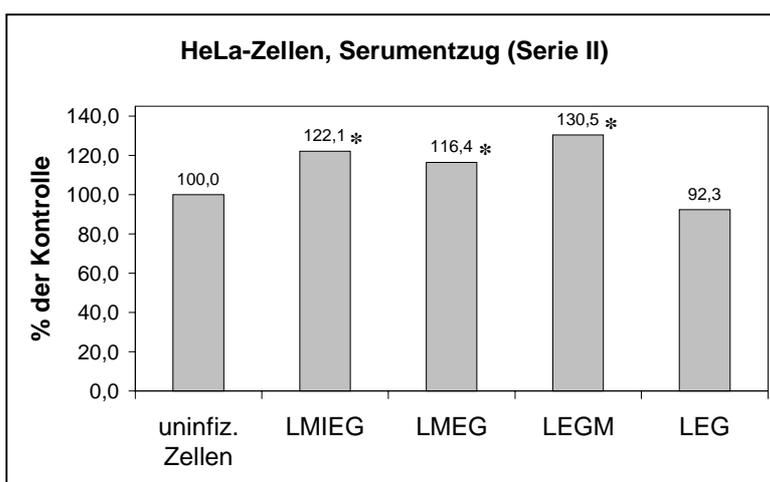


Abb. 12: Proliferationssteigerung von HeLa-Zellen nach Serumentzug (Serie II)

Prozentuale Steigerung der Proliferationsrate von HeLa-Zellen nach Serumentzug für 24h bezogen auf den auf 100% gesetzten Anteil der infizierten Kontrollzellen in der S-Phase.

* $p < 0.05$ (*Student's t Test*), $n=3$.

3.4.1.2 Expressionsanalyse des Merlinproteins

Die Verwendung des Markerproteins EGFP machte es möglich, eine erfolgreiche Infektion der Zellen sowie die Expression der rekombinanten Proteine indirekt über die Auto-Fluoreszenz von EGFP zu kontrollieren. Um wirklich sicherzustellen, dass die Fluoreszenz des EGFP-Markerproteins als Maß für die rekombinante Expression des Merlinproteins benutzt werden konnte, wurde zusätzlich eine Western Blot-Analysen an den infizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Dazu wurden drei identische Blots hergestellt und mit verschiedenen Merlin-Antikörpern inkubiert.

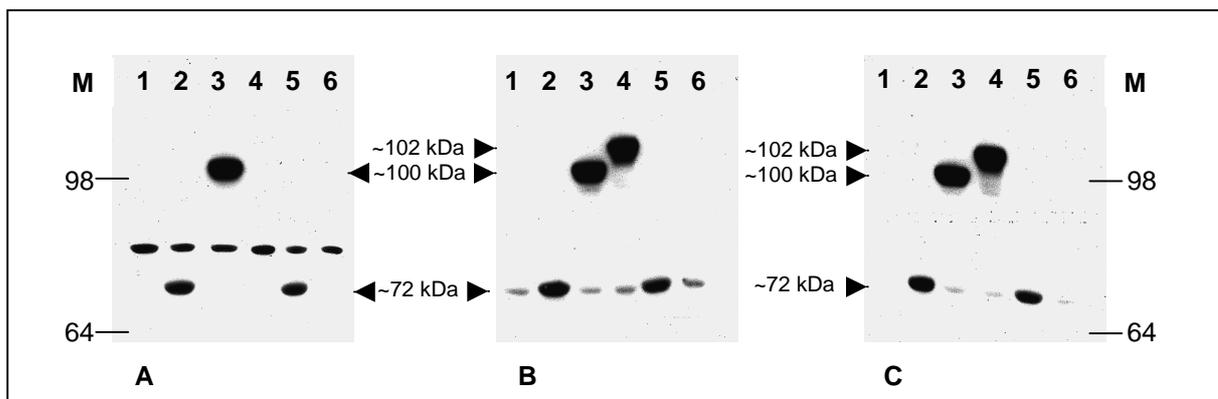


Abb. 13: Expression des Merlinproteins in infizierten HeLa-Zellen

Jeweils 50µg Protein aus uninfizierten Zellen (1) und mit den Virusüberständen LM (2), LEGM (3), LMEG (4), LMIEG (5) und LEG (6) infizierten Zellen wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem C-term. Merlin-AK C18 (A), dem N-term. Merlin-AK A19 (B) sowie dem Merlin-AK WA 30 (C) umgesetzt. M: Molekulargewichtsmarker, Größenangabe in kDa.

Die Western Blot-Analyse (Abb. 13) der verschiedenen stabil infizierten Zellpopulationen ergab, dass die Merlin- bzw. Merlin-EGFP-Fusionsproteine wie erwartet mit den unterschiedlichen Merlin-spezifischen Antikörpern (AK) detektiert werden konnten. Der N-terminale Merlin-AK A19 (Blot B) und der WA 30-AK (Blot C) detektierten beide das rekombinante Merlinprotein bei ca. 72 kDa in den mit LM- und LMIEG-Virusüberständen infizierten Zellen. Zusätzlich konnte auch das schwächer exprimierte endogene Merlinprotein gleicher Größe in uninfizierten Zellen und in mit LMEG-, LEGM- und LEG-Virusüberständen infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Proteinbande des endogenen Merlinproteins in uninfizierten Zellen des Western Blot C (Spur 1) ist im Original sichtbar. Beide Antikörper detektierten auch die Merlin-EGFP-Fusionsproteine bei ca. 100 kDa (LEGM) und 102 kDa (LMEG). Der Größenunterschied zwischen den beiden Fusionsproteinen ist durch die Klonierung bedingt. Das Fusionsprotein LMEG ist 13 Aminosäuren länger als LEGM, was zu

dem Größenunterschied von etwa 2 kDa führt, den man in dem verwendeten hochauflösenden Gradientengel beobachtet (Abb. 13).

Der C-terminale Merlin-Antikörper C18 (Blot A) erkannte neben dem rekombinanten Merlinprotein bei 72 kDa auch das endogene Merlinprotein, jedoch nur nach längerer Exposition. Von den beiden Merlin-EGFP-Fusionsproteine detektierte dieser Antikörper nur das Protein, bei dem der Merlinanteil das C-terminale Ende des Fusionsproteins ausbildet (LEGM). Offensichtlich ist im anderen Fusionsprotein (LMEG) der C-terminale Teil des Merlinproteins, den der C18-Antikörper detektiert, nicht frei zugänglich. Zusätzlich wurde von diesem Antikörper in allen Spuren eine Proteinbande oberhalb von 72 kDa markiert, die aufgrund der Größe auf Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Mitgliedern der Band-4.1-Superfamilie hinweist.

Die Western Blot Analyse zeigte außerdem, dass das rekombinante Merlinprotein in Zellen, die entweder mit LM- oder mit LMIEG-Virusüberständen infiziert wurden, ungefähr gleich stark überexprimiert wird (Blot A, B und C). Aufgrund dieser Ergebnisse und der schon genannten Vorteile einer Koexpression von Merlin und EGFP (siehe 3.1), wurde im weiteren Verlauf der Analyse Merlin überexprimierender HeLa-Zellen auf die weitere Verwendung der LM-Virusüberstände verzichtet.

Der Western Blot B wurde nach Entfernen der Merlin spezifischen Immunkomplexe mit einem monoklonalen EGFP-Antikörper nachgefärbt.

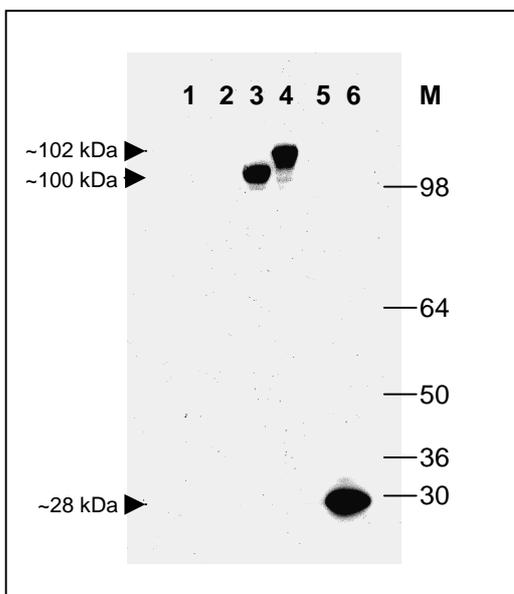


Abb. 14: Expression von EGFP in infizierten HeLa-Zellen

Zur Analyse der EGFP-Expression wurde der Western Blot B (Abb. 14) nach Entfernen der Immunkomplexe mit einem monoklonalen EGFP-Antikörper (Clontech) umgesetzt. 1: uninfizierte Zellen, 2: LM-, 3: LEGM-, 4: LMEG-, 5: LMIEG-, 6: LEG-infizierte Zellen; M: Molekulargewichtsmarker, Größenangabe in kDa.

Mit dem monoklonalen EGFP-Antikörper wurden die vom C-terminalen Merlin-Antikörper C18 detektierten Banden der Merlin-EGFP-Fusionsproteine bestätigt. Zusätzlich erkannte der Antikörper erwartungsgemäß das EGFP-Protein bei etwa 28 kDa in den mit LMIEG-

(Spur 5) und LEG-Virusüberständen (Spur 6) infizierten Zellen. Das EGFP-Signal ist in den LMIEG-infizierten Zellen aufgrund der deutlich schwächeren Expression von EGFP, welche über die interne Ribosomenbindestelle vermittelt wird, nur in der Original-Autoradiografie sichtbar.

Für weitere Analysen wurde nur noch der N-terminale Merlinantikörper verwendet.

3.4.1.3 EGFP-Lokalisierung

Bei der Kultivierung der Merlin überexprimierenden HeLa-Zellen war zu beobachten, dass sich die intrazelluläre Verteilung von EGFP in Abhängigkeit vom Retroviruskonstrukt unterschied. In Zellen die entweder nur EGFP (LEG), oder aber EGFP durch die IRES-Sequenz getrennt von Merlin (LMIEG) exprimierten, war eine homogene Verteilung des EGFP-Proteins im Zytoplasma und im Kern sichtbar. Hingegen zeigte sich bei Zellen, die die beiden Merlin-EGFP-Fusionsproteine (LMEG, LEGM) exprimierten eine verstärkte Lokalisierung des EGFP-Fusionsproteins im Bereich der Plasmamembran. In der Abbildung 15 ist die intrazelluläre Verteilung von EGFP nach Immunfärbung mit einem EGFP-Antikörper dargestellt.

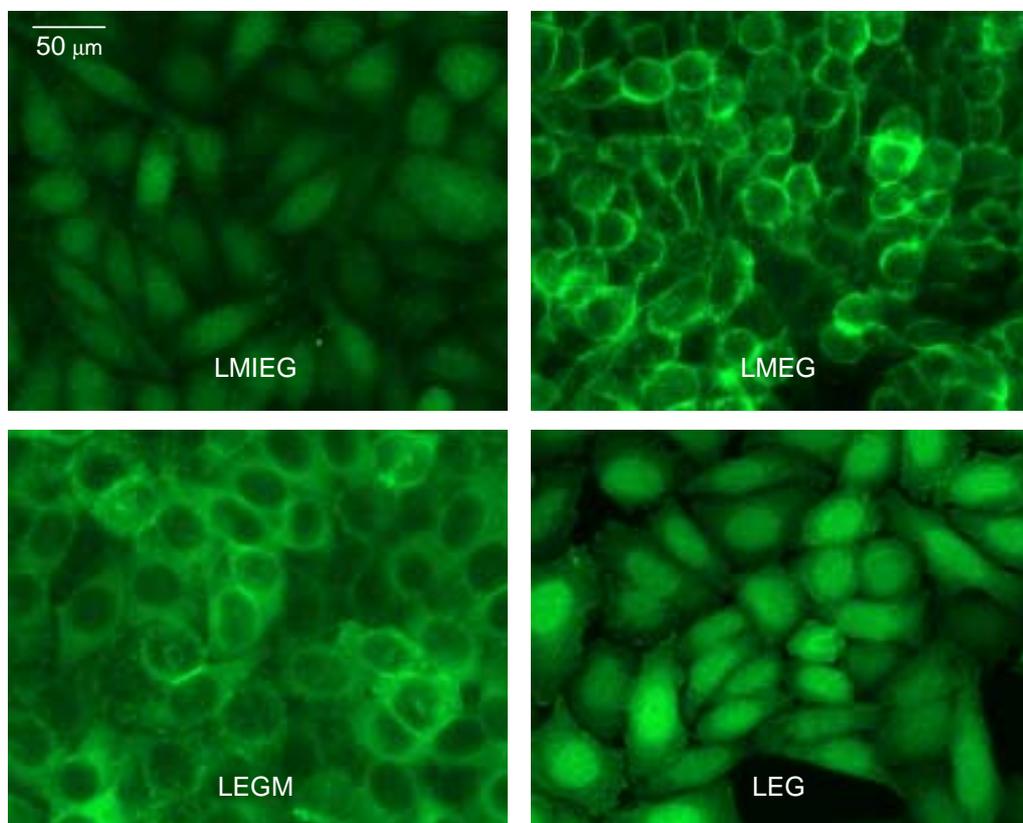


Abb. 15: Intrazelluläre Verteilung von EGFP in Abhängigkeit vom Retroviruskonstrukt

Dargestellt ist die Lokalisierung von EGFP in mit unterschiedlichen Retrovirusüberständen infizierten HeLa-Zellen nach Immunfärbung mit einem polyklonalen EGFP-Antikörper. In Zellen, die mit LMIEG- und LEG-Virusüberständen infiziert wurden, zeigt sich eine homogene Verteilung von EGFP, während die an Merlin gekoppelte EGFP-Expression zu einer verstärkten Lokalisierung der EGFP-Fusionsproteine im Bereich der Plasmamembran führt (LMEG, LEGM).

3.4.1.4 Zellmorphologie

Merlin überexprimierende HeLa-Zellen (LMIEG, LMEG, LEGM) zeigen gegenüber uninfizierten Zellen oder nur EGFP exprimierenden Zellen (LEG) eine deutlich veränderte Morphologie (Abb. 16). Während die Kontrollzellen neben einer eher rundlichen zu etwa gleichen Teilen auch eine langgestreckte Morphologie aufweisen, haben die Merlin überexprimierenden Zellen fast ausschließlich eine rundliche Form. Neben dieser, die gesamte Zellform betreffende Veränderung, weisen die Merlin überexprimierenden Zellen zudem einen stark gewellten Plasmasaum auf.

Die beobachteten morphologischen Veränderungen waren über den gesamten Kultivierungszeitraum der einzelzellklonierten HeLa-Zellen von 8 Monaten sichtbar.

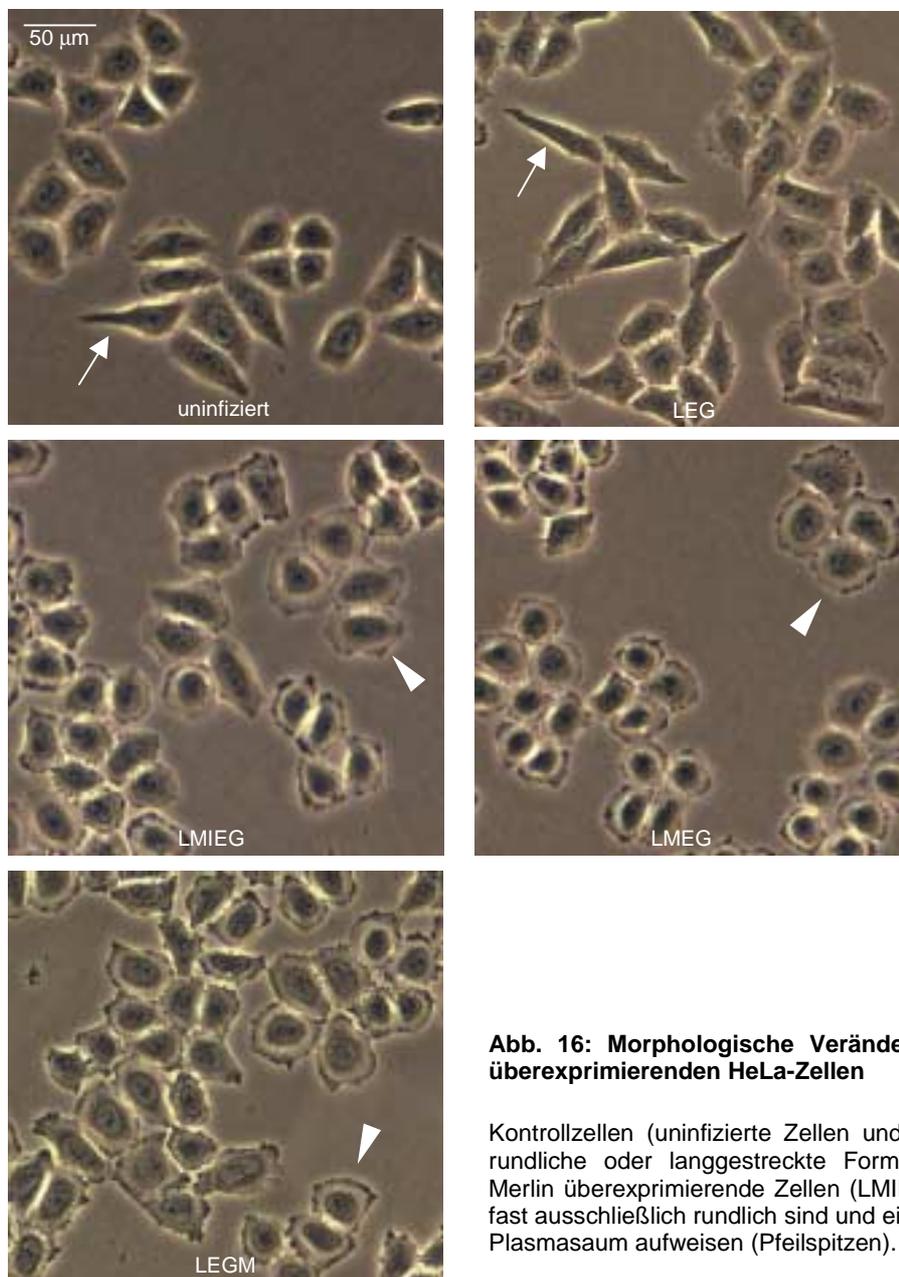


Abb. 16: Morphologische Veränderungen in Merlin überexprimierenden HeLa-Zellen

Kontrollzellen (uninfizierte Zellen und LEG) haben eine rundliche oder langgestreckte Form (Pfeile), während Merlin überexprimierende Zellen (LMIEG, LMEG, LEGM) fast ausschließlich rundlich sind und einen stark gewellten Plasmasaum aufweisen (Pfeilspitzen).

3.4.1.5 Actinfärbung

Von STS26T-Zellen war bekannt, dass die Behandlung mit Merlin-antisense-Oligonukleotiden zu Änderungen im Actinzytoskeletts und daraus resultierend zu Veränderungen der Zellmorphologie führte (Huynh und Pulst, 1996). Um zu überprüfen ob die morphologischen Veränderungen, die nach Überexpression von Merlin in HeLa-Zellen beobachtet wurden, möglicherweise auch auf Veränderungen im Actinzytoskelett zurückzuführen waren, wurden die Actinfilamente der verschiedenen rekombinanten HeLa-Klone mit FITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt. Wie in Abbildung 17 dargestellt ist, konnten keine Unterschiede in der Struktur der Actinfilamente von Kontrollzellen (uninfizierte und LEG-infizierte Zellen) und Merlin überexprimierenden Zellen detektiert werden (LMIEG, LMEG, LEGM).

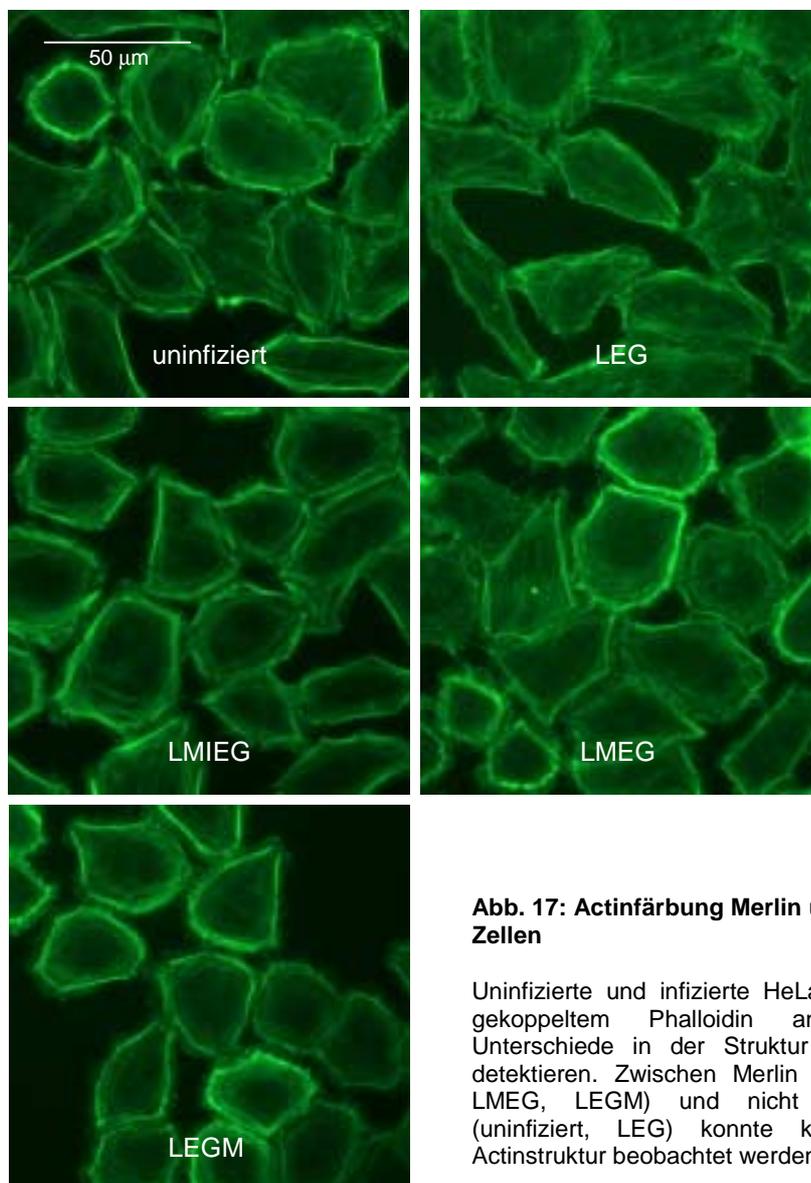


Abb. 17: Actinfärbung Merlin überexprimierender HeLa-Zellen

Uninfizierte und infizierte HeLa-Zellen wurden mit FITC-gekoppeltem Phalloidin angefärbt, um mögliche Unterschiede in der Struktur des Actinzytoskeletts zu detektieren. Zwischen Merlin reexprimierenden (LMIEG, LMEG, LEGM) und nicht reexprimierenden Zellen (uninfiziert, LEG) konnte kein Unterschied in der Actinstruktur beobachtet werden.

3.4.1.6 Apoptose

Da die Verminderung der normalen Apoptoserate einer der zentralen Schritte im *multistep*-Prozess der Tumorentwicklung ist und zudem bekannt war, dass die Überexpression von Merlin die Apoptoserate primärer Schwanzzellen beeinflusst (Herrlich *et al.*, 2000), wurde die Apoptoserate von Merlin überexprimierenden HeLa-Zellen und uninfizierten Kontrollzellen mittels TUNEL-Methode bestimmt

Für die mikroskopische Auswertung wurden mindestens 500 Zellen pro untersuchter Zellpopulation am Mikroskop ausgezählt und der Prozentsatz fluoreszierender, d.h. apoptotischer Zellen an der Gesamtzahl berechnet. In den mit dem LMIEG-Virusüberstand infizierten Zellen konnte bei einer untersuchten Gesamtzahl von 531 Zellen nur eine einzelne apoptotische Zelle detektiert werden (Apoptoserate <0.2%), während in allen anderen Merlin überexprimierenden HeLa-Zellkulturen sowie in den uninfizierten Kulturen keine Apoptose nachweisbar war. Die Apoptoserate von HeLa-Zellen wird demnach durch eine Überexpression des Merlinproteins nicht beeinflusst.

3.4.2 Analyse Merlin überexprimierender NIH3T3-Zellen

3.4.2.1 Expressionsanalyse des Merlinproteins

Trotz der Möglichkeit, die Expression der rekombinanten Proteine indirekt über die Auto-Fluoreszenz des Markerproteins EGFP zu kontrollieren, wurde zusätzlich auch eine Western Blot-Analyse der Merlin überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen durchgeführt.

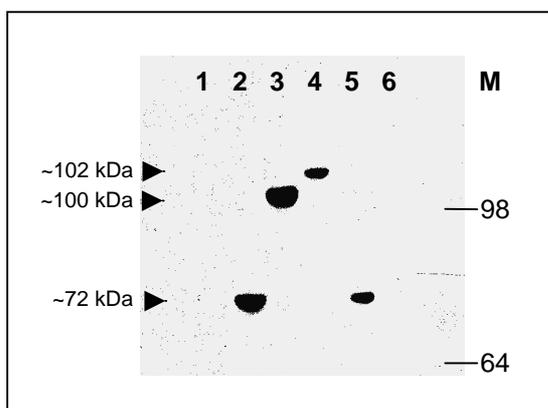


Abb. 18: Expression des Merlinproteins in infizierten und uninfizierten NIH3T3-Zellen

Jeweils 50µg Protein aus uninfizierten Zellen (1) und mit den Virusüberständen LM (2), LEGM (3), LMEG (4), LMIEG (5) und LEG (6) infizierten Zellen wurde in einem Gradientengel (5-10%) aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem N-term. Merlin-AK A19 umgesetzt.
M: Molekulargewichtsmarker, Größenangabe in kDa.

Die Western Blot-Analyse der verschiedenen stabil infizierten NIH3T3-Zellpopulationen bestätigte, dass die mit LM- und LMIEG-Virusüberständen infizierten Zellen das rekombinante Merlinprotein (ca. 72 kDa) exprimieren, während Zellen, die mit LMEG- und LEGM- Virusüberständen infiziert worden waren, die Merlin-EGFP-Fusionsproteine (ca. 102 bzw. 100 kDa) exprimieren.

Eine Expression von endogenem Merlinprotein konnte in den NIH3T3-Zellen unter den verwendeten Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

3.4.2.2 Proliferationsanalyse

Da Experimente an Merlin überexprimierenden HeLa-Zellen einen unerwarteten, proliferationssteigernden Effekt der Merlin-Expression aufzeigten, wurden diese Experimente an NIH3T3-Zellen, einer weiteren, gut charakterisierten Zelllinie wiederholt.

Die Merlin überexprimierenden NIH3T3-Zellen wurden mit unterschiedlichen Zelldichten von 50.000 und 150.000 Zellen/cm² ausgesät, um das Proliferationsverhalten unter subkonfluenten und konfluenten Kulturbedingungen testen zu können. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit RNase A behandelt und die genomische DNA wurde mit Propidiumjodid (PI) angefärbt. Die Zuordnung der Zellen zu den verschiedenen Phasen des Zellzyklusses erfolgte nach durchflusszytometrischer Analyse (FACS) mit Hilfe des Programms ModFit (Becton Dickinson), bei dem die verschiedenen Zellzyklusphasen aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehaltes der Zellen ermittelt werden können. Bei dieser Methode unterscheidet man Zellen in der G₀/G₁-Phase mit einfachem Chromosomensatz, von Zellen in der G₂/M-Phase mit doppeltem Chromosomensatz und von replizierenden Zellen in der S-Phase, die einen DNA-Gehalt zwischen einfachem und doppeltem Chromosomensatz besitzen (Abb. 19).

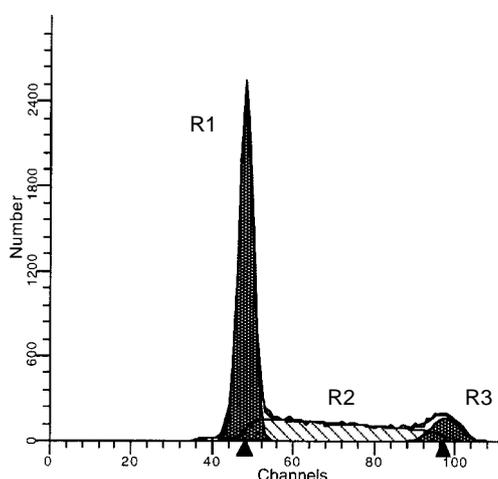


Abb. 19: Repräsentative Darstellung einer Zellzyklusauswertung aufgrund des DNA-Gehaltes von Zellen

Histogramm Darstellung des DNA-Gehaltes infizierter NIH3T3-Zellen. R1: G₀/G₁-Zellen, einfacher DNA-Gehalt; R2: S-Phase-Zellen, zunehmender DNA-Gehalt; R3: G₂/M-Zellen, doppelter DNA-Gehalt; Number: Zellzahl; Channels: Messkanäle

Zusammenfassung der Proliferationsdaten von **subkonfluenten NIH3T3-Zellkulturen** 24h nach der Aussaat von **50.000 Zellen/cm²**:

sortierte NIH3T3- Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M	
uninf. Zellen	59.0	31.5	9.6	31.7
	58.6	31.8	9.6	
	57.8	31.8	10.3	
LMIEG	57.7	31.5	10.8	31.7
	58.2	31.2	10.6	
	57.8	32.4	9.9	
LMEG	53.0	32.9	14.2	33.0
	50.9	33.9	15.2	
	54.1	32.1	13.8	
LEGM	56.7	33.3	10.0	33.4
	56.0	34.3	9.7	
	58.2	32.5	9.4	
LEG	54.6	34.9	10.5	34.6
	55.4	33.8	10.8	
	55.2	35.0	9.8	

Tab. 7: Zellzyklusanalyse von Merlin überexprimierenden NIH3T3-Zellen (niedrige Zelldichte)

Anteil der verschiedenen Zellzyklusphasen an der Gesamtzahl infizierter und uninfizierter NIH3T3-Zellen. Die Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit einer Dichte von *50.000 Zellen/cm²* ausgesät und 24h nach dem Umsetzen analysiert.

Zusammenfassung der Proliferationsdaten von **konfluenten NIH3T3-Zellkulturen** 24h nach der Aussaat von **150.000 Zellen/cm²**:

sortierte NIH3T3- Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M	
uninf. Zellen	74.7	13.5	11.8	14.1
	74.2	15.2	10.6	
	74.1	13.5	12.4	
LMIEG	71.8	16.5	11.6	16.5
	72.2	16.1	11.8	
	70.4	16.9	12.7	
LMEG	68.8	16.0	15.2	16.6
	68.4	16.7	14.9	
	66.3	17.2	16.5	
LEGM	76.6	14.2	9.2	14.9
	76.4	15.3	8.3	
	73.5	15.2	11.4	
LEG	76.5	13.7	9.8	14.1
	76.8	13.6	9.7	
	75.6	15.0	9.5	

Tab. 8: Zellzyklusanalyse von Merlin überexprimierenden NIH3T3-Zellen (hohe Zelldichte)

Anteil der verschiedenen Zellzyklusphasen an der Gesamtzahl infizierter und uninfizierter NIH3T3-Zellen. Die Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten mit einer Dichte von *150.000 Zellen/cm²* ausgesät und 24h nach dem Umsetzen analysiert.

Die in den Tabellen 7 und 8 aufgeführten Zellzyklusanalysen von stabil Merlin überexprimierenden NIH3T3-Zellpopulationen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Proliferationsrate ($p > 0.05$, *Student's t Test*) von infizierten und uninfizierten Zellen. Beobachtete geringe Unterschiede, wie man sie zwischen den berechneten Mittelwerten beobachtet, sind für die hier verwendete Auswertemethode nicht signifikant. Daraus ergibt sich, dass in hochreinen, stabil Merlin überexprimierenden NIH3T3-Zellpopulationen unter verschiedenen Zelldichte-Bedingungen ein Effekt der Merlinüberexpression auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte.

3.4.2.3 EGFP-Lokalisierung und Zellmorphologie

Die Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von EGFP in Abhängigkeit vom verwendeten Retroviruskonstrukt, wie sie bereits für HeLa-Zellen gezeigt wurden (3.4.1.3), konnten ebenso in den infizierten NIH3T3-Zellkulturen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Demgegenüber traten die für NIH3T3-Zellen nach Merlin Überexpression beschriebenen starken morphologischen Veränderungen (Lutchmann und Rouleau, 1995) nicht auf.

3.5 Charakterisierung von Merlin reexprimierenden NF2-Schwanzzellen

3.5.1 Optimierung der Infektionseffizienz

Primäre Schwanzzellen haben verglichen mit vielen etablierten Zelllinien geringere Proliferationsraten und werden daher von Retroviren, die nur ins Genom von mitotisch aktiven Zellen integrieren, schlechter transduziert (Miller *et al.*, 1990). Aus diesem Grund war es notwendig, die Infektionen der NF2-Schwanzzellen unter möglichst optimalen Bedingungen durchzuführen. Für die Optimierung der Infektionseffizienz wurden neben Schwannomzellen des Tumors NF2.11 auch humane Schwanzzellen aus Nervenbiopsien von zwei Multiorganspendern (MOS) verwendet, die zu diesem Zeitpunkt in Kultur genommen wurden. Die Infektionen wurden mit Überständen des Virus pgLEG durchgeführt und die Infektionseffizienz wurde durch FACS-Analyse der EGFP-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten (48-72h) bestimmt.

In einem ersten Schritt wurde getestet, ob sich die Infektionseffizienz proportional zur Infektionszeit (5h, 8h und 24h) erhöht. Dies war, anders als bei Zelllinien, nicht unbedingt zu erwarten, da den zur Infektion verwendeten Virusüberständen zum einen wichtige Faktoren für die Kultivierung von Schwannzellen fehlten. Zum anderen war nicht auszuschließen, dass die Virusüberstände Substanzen enthalten, die von den zur Produktion der Überstände verwendeten Verpackungszellen abgesondert worden waren und toxisch auf die primären Schwannzellen wirkten (Tab. 9A). In einem zweiten Test wurde den zur Infektion verwendeten Virusüberständen ein Mix aus Forskolin, IBMX, Insulin und dem Glia-Wachstumsfaktor β 1-Heregulin in solchen Konzentrationen zugesetzt, wie sie auch dem normalen Medium bei der Kultivierung von humanen Schwannzellen zugesetzt werden. Die erreichten Infektionseffizienzen wurden dann nach 5h, 8h und 24h bestimmt (Tab. 9B).

A	Infektionszeit	MIX	MOS 56/2°	MOS 56/3°	MOS55/1°	MOS 55/2°	NF 2.11/1°
	5h	-	59%	23%	31%	19%	19%
8h	-	55%	29%	33%	28%	24%	
24h	-	-	-	31%	34%	27%	

B	5h	+			37%	43%	27%
	8h	+			44%	53%	30%
24h	+			55%	53%	38%	

Tab. 9: Optimierung der Infektionseffizienz von humanen Schwannzellen

Humane Schwannzellen aus zwei Multiorganspender-Nerven (MOS 55: 1. und 2. Passage und MOS 56: 2. und 3. Passage) und einem NF2-Tumor (NF2.11) wurden über verschiedene Zeiträume mit und ohne Zusatz von Forskolin, IBMX, Insulin und β 1-Heregulin (MIX) mit Überständen des Virus pgLEG (MOI 5) infiziert. Angegeben ist die Anzahl EGFP-exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl.

Wie die Tabelle 9A zeigt, führte eine Verlängerung der Infektionszeit nicht in jedem Fall zu einer Erhöhung der Infektionseffizienz. Während bei den Schwannzellen MOS 56 der 2. und 3. Passage und MOS 55 der 1. Passage eine Verlängerung der Infektionszeit kaum einen positiven Effekt auf die Infektionseffizienz hatte, wurden die MOS 55-Zellen der zweiten Passage und die NF2.11-Zellen mit zunehmender Infektionszeit besser transduziert.

Interessanterweise führte eine Verlängerung der Infektionszeit in Verbindung mit dem Zusatz von Forskolin, IBMX, Insulin und β 1-Heregulin (MIX) zum Virusüberstand (Tab. 9B) in jedem Fall zu einer gesteigerten Transduktion. Da die Zellen auch nach einer Infektion über 24h keine Anzeichen von Stress zeigten (Abrunden der Zellen oder Ablösen vom Untergrund),

erfolgten alle weiteren Infektionen von NF2-Schwanzzellen über 3x24h. Dabei wurden die NF2-Schwanzzellen über insgesamt 72h mit den jeweiligen Virusüberständen inkubiert, wobei jedoch nach jeweils 24h ein „Medienwechsel“ mit frischen Virusüberständen und MIX erfolgte. Mit diesem Infektionsverfahren wurden bei den NF2-Schwanzzellen Infektionseffizienzen von bis zu 57% erreicht.

3.5.2 Infektion der Schwannomzellen NF2.6, NF2.11 und NF2.13

Zur Vorbereitung der funktionellen Untersuchungen der Merlin Reexpression in NF2-Schwanzzellen wurden die retroviralen Infektionen an Schwannomzellen aus drei unabhängigen Tumoren durchgeführt (NF2.6, NF2.11, NF2.13). Der Tumor NF2.6 wurde aus einem Patienten isoliert, der in der Keimbahn eine *missense*-Mutation im Exon 15 (1613 A→C) des NF2-Gens trägt. Tumor NF2.13 stammt von einem Patienten mit einer Rasterschubmutation im Exon 8 (del 717 G). Die LOH Analyse (Untersuchung interner oder flankierender polymorpher Marker im NF2-Gen) ergab in beiden Fällen einen Verlust des zweiten NF2-Allels im Tumor. Der Tumor NF2.11 wurde einem Patienten mit einer Stoppmutation in Exon 8 (784 C→T) entnommen. Eine LOH- oder SSCP-Analyse dieses Tumors wurde nicht durchgeführt, das Gewebe wurde aber durch eine histologische Untersuchung einwandfrei als NF2-Schwannom bestätigt.

Die NF2 Schwanzzellen aus den drei Tumoren wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 24h mit den in PG13-Verpackungszellen produzierten GALV-pseudotypisierten Retrovirusüberständen (2.3.4) infiziert (MOI 5). Um die Zellen über einen Zeitraum von 72h mit Retrovirusüberständen kultivieren zu können, wurden die für die Proliferation von humanen Schwanzzellen notwendigen Substanzen den Überständen zugefügt (2.4.6). Für die Infektionen wurden die Überstände der 4. Sammlung von 11/99 benutzt (3.2.).

3.5.3 Infektionseffizienz

Die Effizienz der Retrovirusinfektionen wurde über die Expression des Markerproteins EGFP mittels FACS-Analyse bestimmt. Berechnet wurde der Anteil der EGFP exprimierenden Zellen an der Gesamtpopulation. Die Analyse wurde 5-7 Tage nach Ende der Infektion parallel mit der jeweiligen BrdU-Immunfärbung durchgeführt.

Im einzelnen wurden primäre NF2.6-Schwannomzellen in der 0. Passage (nach dem proteolytischen Verdau des Tumorgewebes) sowie NF2.11- und NF2.13-Schwannomzellen in der 1. Passage infiziert. Die Effizienz, mit der sich die Zellen mit den einzelnen Virusüberständen infizieren ließen, wurde sieben Tage (NF2.6), sechs Tage (NF2.11) bzw. fünf Tage (NF2.13) nach dem Infektionsende bestimmt.

Folgende Anteile EGFP-exprimierender Zellen an der Gesamtzahl infizierter Zellen wurden ermittelt:

EGFP exprimierende Zellen			
Virus	NF2.6	NF2.11	NF2.13
LMIEG	35%	19 %	29 %
LMEG	44%	25 %	31 %
LEGM	47%	25 %	35 %
LEG	50%	33 %	57 %
Tage nach Infektion	7	6	5

Tab. 10: Übersicht über die erzielten Infektionseffizienzen (Anteil EGFP-exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl) bei den Schwannomzellen NF2.6, NF2.11 und NF2.13.

3.5.4 Expressionsanalyse des Merlinproteins

Auch im Fall der infizierten NF2-Zellen wurde die Expression der rekombinanten Proteine nicht nur indirekt über die Auto-Fluoreszenz des Markerproteins EGFP kontrolliert, sondern ebenfalls durch eine Western Blot-Analyse. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob sich mutiertes Merlinprotein in den Schwannomzellen des verwendeten Tumor NF2.13 detektieren lässt, was aufgrund des beschriebenen geringen Unterschiedes der Halbwertszeiten von Wildtyp-Merlinprotein (20h) und mutiertem Merlinprotein (17h) in Kulturzellen möglich sein sollte (Gutmann *et al.*, 1998).

Für die Western Blot-Analyse wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein von den uninfizierten und infizierten Zellen elektrophoretisch aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose Membran mit dem N-terminalen Merlin-Antikörper AK 19 inkubiert.

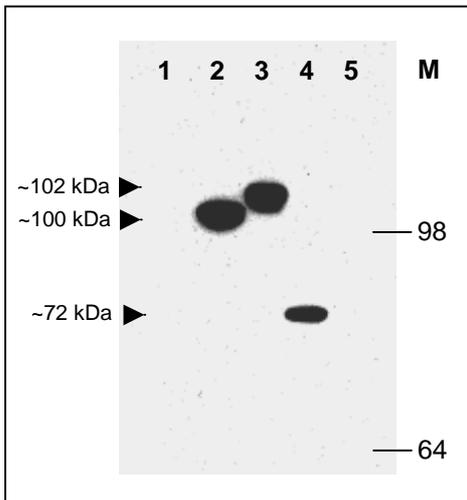


Abb. 20: Expression des Merlinproteins in infizierten und uninfizierten NF2.13-Zellen

Je 50µg Gesamtprotein aus uninfizierten Zellen (1) und mit den Virusüberständen LEGM (2), LMEG (3), LMIEG (4) und LEG (5) infizierten Zellen wurde in einem 5-10%igen PAA-Gel aufgetrennt, und nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit dem N-terminalen Merlin-AK A19 umgesetzt.

M: Molekulargewichtsmarker, Größenangabe in kDa.

Die Abbildung 20 zeigt die bereits in den Western Blot-Analysen infizierter HeLa- und NIH3T3-Zellen detektierten Banden der Merlin-EGFP-Fusionsproteine bei 99kDa (LEGM) und 103 kDa (LMEG), sowie die Bande des rekombinanten Merlinproteins bei 72kDa (LMIEG). Endogenes Merlinprotein (72 kDa), das mit dem hier verwendeten N-terminalen Merlin-Antikörper in HeLa-Zellen nachgewiesen werden konnte (3.4.1.2), konnte in den NF2.13-Zellen auch nach längerer Exposition nicht detektiert werden.

3.5.5 Proliferationsanalyse

Zur Analyse der Proliferation von kultivierten NF2-Schwannzellen nach Reexpression von Wildtyp-Merlin wurden infizierte NF2-Schwannomzellen 1-2 Tage nach der Infektion mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen/cm² ausplattiert. Weitere 1-2 Tage später wurden die Zellen für 72h mit 10µM BrdU inkubiert. Zellzyklus-Analysen wurden als Doppelbestimmung mittels Immunfärbung mit einem FITC-gekoppelten BrdU-Antikörper und nachfolgender FACS-Auswertung durchgeführt.

3.5.5.1 Proliferationsergebnisse NF2.6

Die Proliferationsraten der in der 0. Passage (nach dem proteolytischen Verdau des Tumorgewebes) infizierten NF2.6 Schwannomzellen wurden in der 1. Passage (sieben Tage nach dem Ende der Infektion) ermittelt.

Ein Vergleich der Proliferationsraten der mit den verschiedenen Retrovirus-Konstrukten infizierten NF2-Tumorzellen (Tab. 11) zeigt, dass die Reexpression der Merlin-cDNA in NF2.6-Schwannomzellen zu einer deutlichen Absenkung der Proliferationsrate nicht nur gegenüber uninfizierten sondern auch gegenüber den mit dem Kontrollvirus infizierten Zellen (pgLEG) führte. Uninfizierte Zellen proliferierten durchschnittlich mit einer Rate von 36.6%, während die mit verschiedenen Virusüberständen infizierten Zellen eine mittlere Proliferationsrate von nur 27.5% (pgLMIEG), 26.3% (pgLMEG) und 25.8% (pgLEGM) zeigten. Das entspricht einer Reduzierung der Proliferationsrate von Merlin-reexprimierenden NF2-Zellen auf nur noch 70-75% der Proliferationsaktivität uninfizierter Schwannomzellen (Abb. 21). NF2-Zellen, die mit dem EGFP exprimierenden Kontrollvirus pgLEG infiziert wurden, proliferierten mit einer durchschnittlichen Rate von 35.9% und unterschieden sich damit nicht signifikant von den uninfizierten Kontrollzellen.

NF2.6 Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M	
uninf. Zellen	55.0	36.6	7.5	
LMIEG	64.0 62.5	26.9 28.0	8.2 8.4	27.5
LMEG	63.6 65.8	27.4 25.2	8.1 7.9	26.3
LEGM	65.0 64.4	25.7 25.8	8.4 8.6	25.8
LEG	58.4 55.8	35.1 36.6	5.6 6.7	35.9

Tab. 11: Zellzyklusanalyse infizierter NF2.6 Schwannzellen

Auflistung der Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen an der Gesamtzahl infizierter und uninfizierter NF2.6-Schwannzellen nach 72h BrdU-Einbau. Die Proliferationsraten wurden sieben Tage nach Infektionsende bestimmt und stammen aus je zwei unabhängigen Experimenten.

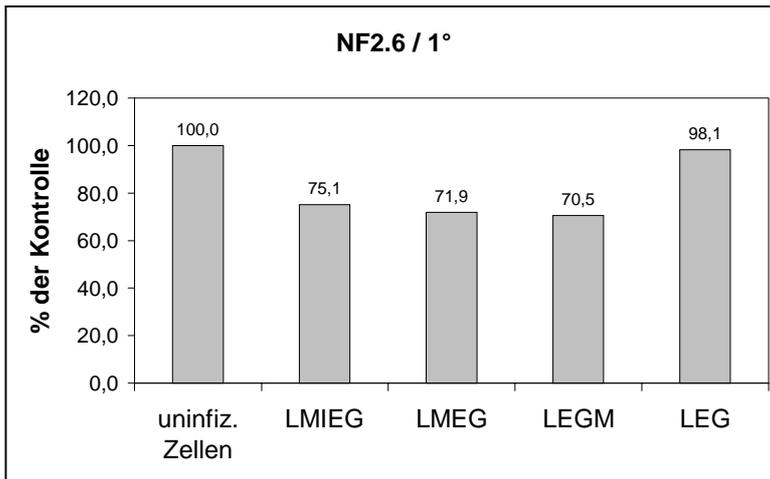


Abb. 21: Absenkung der Proliferationsrate (S-Phase) in infizierten NF2.6 Zellen

Angegeben ist der Prozentsatz infizierter Zellen in der S-Phase bezogen auf den auf 100% gesetzten Anteil der uninfizierten Kontrollzellen in der S-Phase.

3.5.5.2 Proliferationsergebnisse NF2.11

Die Infektion der NF2.11 Schwannomzellen erfolgte in der 1. Passage. Die Proliferationsraten wurden in der 2. Passage (sechs Tage nach der letzten Infektion) ermittelt.

Beim Vergleich der Proliferationsraten der NF2.11-Schwannomzellen (Tab. 12) zeigt sich, dass die Merlin-Reexpression auch in diesen Schwannomzellen zu einer Absenkung der Proliferationsrate gegenüber uninfizierten oder mit dem Kontrollvirus (pgLEG) infizierten Zellen führte. Allerdings ist der Effekt der Proliferationsminderung nicht so deutlich, wie bei den NF2.6-Schwannomzellen. Einer durchschnittlichen Proliferationsrate der uninfizierten NF2.11-Zellen von 41.2% stehen Raten von 36.4% (pgLMIEG), 36.1% (pgLMEG) und 36.2% (pgLEGM) bei den mit den Merlin-Konstrukten infizierten Zellen gegenüber. Das entspricht einer Verminderung der Proliferation Merlin reexprimierender Zellen auf ca. 88% der Proliferation uninfizierter Schwannomzellen (Abb. 22). Diese Abnahme ist durchgehend in den Messungen aller unabhängigen Experimente und mit allen drei Merlin-Viruskonstrukten sichtbar. Die Proliferationsrate der mit dem Kontrollvirus pgLEG infizierten Zellen ist mit 39.8% gegenüber den uninfizierten Kontrollzellen erneut nicht deutlich verändert.

Die Zellzyklusdaten der mit pgLEG infizierten Zellen wurden nach einer weiteren Zellpassage, am Tag 13 nach der Infektion bestimmt, was eine leichte Verschiebung der Anteile in der G₀/G₁- bzw. G₂/M-Phase bewirkte (Tab. 12).

NF2.11 Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M	
uninf. Zellen	54.7	40.6	4.4	41.2
	54.1	41.8	3.8	
LMIEG	57.8	36.4	5.5	36.4
	58.0	36.3	5.2	
LMEG	57.7	36.9	5.1	36.1
	59.2	35.3	5.0	
LEGM	59.1	35.5	5.1	36.2
	57.9	36.8	4.9	
LEG	46.4	39.4	13.3	39.8
	47.3	40.1	11.5	

Tab. 12: Zellzyklusanalyse infizierter NF2.11-Schwanzzellen

Auflistung der Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen an der Gesamtzahl infizierter und uninfizierter NF2.11-Schwanzzellen nach 72h BrdU-Einbau. Die Proliferationsraten wurden sechs Tage nach beendeter Infektion bestimmt und stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die mit pgLEG-infizierten Zellen wurden unter gleichen Bedingungen, aber in einer späteren Passage (3^o) gemessen.

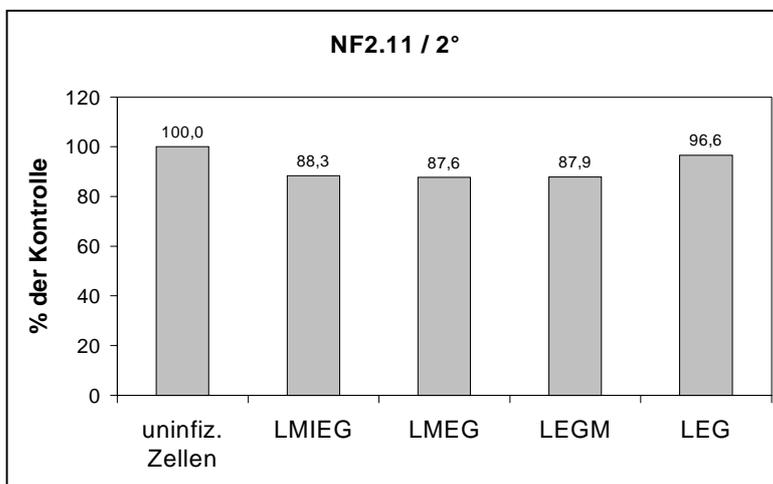


Abb. 22: Absenkung der Proliferationsrate (S-Phase) in infizierten NF2.11-Zellen

Angegeben ist der Prozentsatz infizierter Zellen in der S-Phase bezogen auf den auf 100% gesetzten Anteil der uninfizierten Kontrollzellen in der S-Phase

2.5.5.3 Proliferationsergebnisse NF2.13

Für die Infektion von NF2.13 Schwannomzellen wurden Zellen aus der 1. Passage verwendet. Die Messung der Proliferationsraten erfolgte in der 2. Passage (fünf Tage nach Beendigung der letzten Infektion).

Vergleicht man die in Tabelle 13 aufgeführten Proliferationsraten der Merlin reexprimierenden NF2.13-Zellen mit denen der uninfizierten und pgLEG-infizierten NF2.13-Kontrollzellen, so wird erneut ein die Proliferation reduzierender Effekt der Merlinre-expression bestätigt. Während uninfizierte Zellen durchschnittlich zu 50.6% bzw. pgLEG-infizierte Zellen zu 48.4% proliferierten, zeigten die mit pgLMIEG-, pgLMEG- bzw. pgLEGM-Virusüberständen infizierten Zellen eine mittlere Proliferationsrate von nur 28.1%, 27.8% bzw. 34.9%. Das bedeutet eine Reduzierung der Proliferationsaktivität der Merlin reexprimierenden Zellen auf ca. 55% (LMIEG, LMEG) bzw. 69% (LEGM) der Proliferation

uninfizierter NF2.13-Schwannomzellen (Abb. 23). Infizierte Kontrollzellen (LEG) zeigten erneut keine wesentliche Reduktion der Proliferation (95.7%).

NF2.13 Zellen	Zellzyklus Phasen (%)			Mittelwert S-Phase
	G ₀ /G ₁	S-Phase	G ₂ /M	
uninf. Zellen	44.4 43.6	50.1 51.0	4.8 4.8	50.6
LMIEG	62.5 62.4	28.3 27.9	8.9 8.7	28.1
LMEG	63.0 61.8	27.8 27.7	8.9 8.9	27.8
LEGM	55.9 56.2	35.2 34.6	8.3 8.4	34.9
LEG	44.6 45.7	48.9 47.9	5.3 5.3	48.4

Tab. 13: Zellzyklusanalyse infizierter NF2.13-Schwannzellen

Auflistung der Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen an der Gesamtzahl infizierter und uninfizierter NF2.11-Schwannzellen nach 72h BrdU-Einbau. Die Proliferationsraten wurden fünf Tage nach beendeter Infektion bestimmt und stammen aus zwei unabhängigen Experimenten.

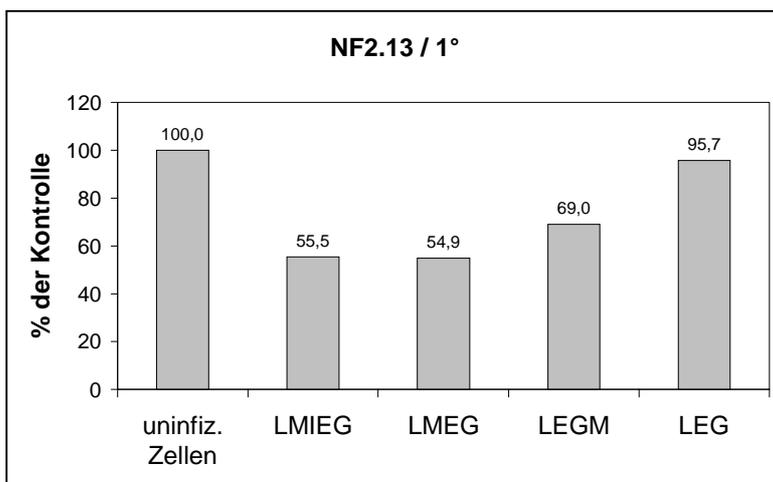


Abb. 23: Absenkung der Proliferationsrate (S-Phase) in infizierten NF2.13-Zellen

Angegeben ist der Prozentsatz infizierter Zellen in der S-Phase bezogen auf den auf 100% gesetzten Anteil der uninfizierten Kontrollzellen in der S-Phase

3.5.6 EGFP-Lokalisierung

Die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung von EGFP in Abhängigkeit vom Retroviruskonstrukt, die schon bei den HeLa- und NIH3T3-Zelllinien zu beobachten war (3.4.1.3), wurde auch in infizierten NF2-Schwannzellen detektiert.

In NF2-Schwanzzellen die mit LEG- und LMIEG-Virusüberständen infiziert wurden, fand sich im Zytoplasma und im Kern eine homogene Verteilung des separat exprimierten EGFP-Proteins. Die Expression der Merlin-EGFP-Fusionsproteine führte hingegen zu einer verstärkten Ansammlung von EGFP im Bereich der Plasmamembran. Die Abbildung 24 zeigt die Verteilung von nativem EGFP in den mit verschiedenen Virusüberständen infizierten NF2.13-Schwanzzellen.

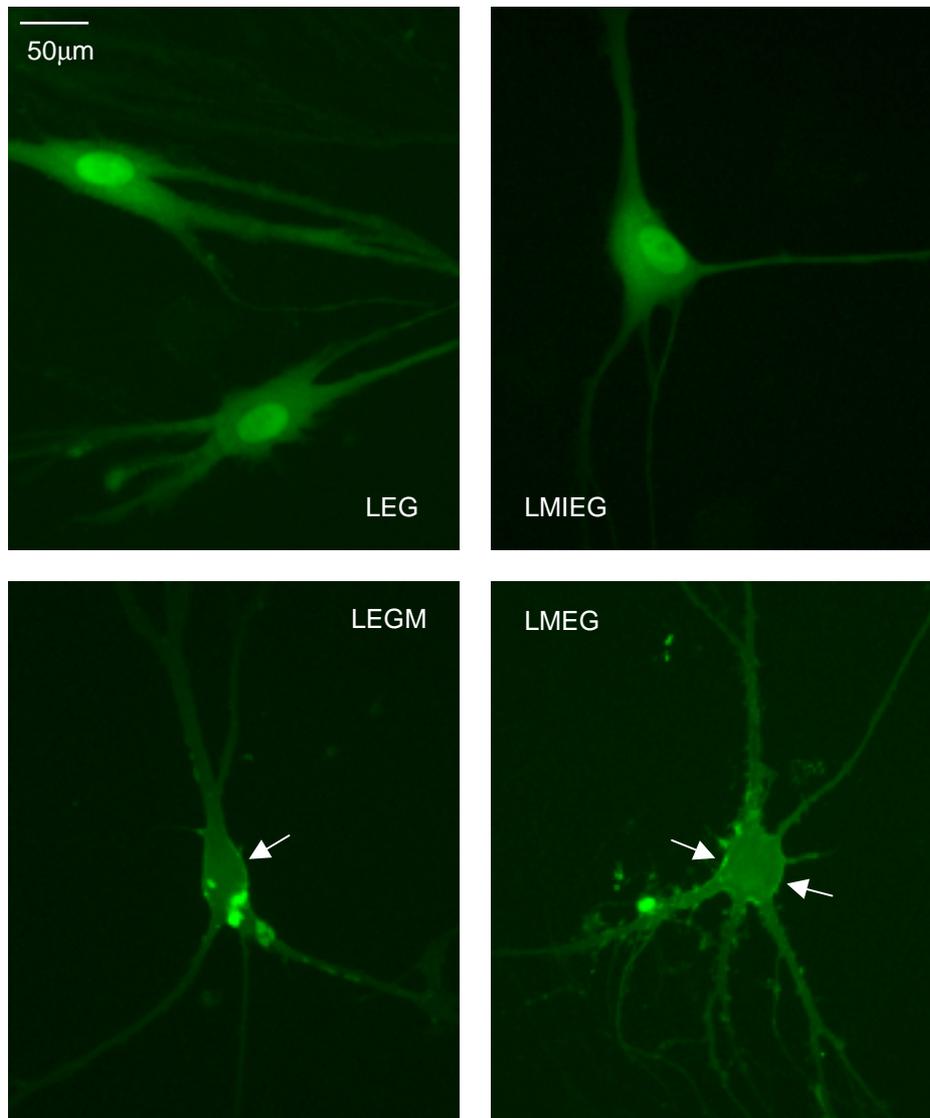


Abb. 24: Repräsentative Darstellung der intrazellulären Verteilung von nativem EGFP in NF2.13-Schwanzzellen in Abhängigkeit vom verwendeten Retroviruskonstrukt

Dargestellt ist die zelluläre Lokalisierung von nativem EGFP in infizierten NF2-Schwanzzellen 8 Tage nach der Infektion. Zellen die mit LEG- und LMIEG-Virusüberständen infiziert wurden, zeigten in Kern und Zytoplasma eine homogene Verteilung von EGFP. Bei Zellen die mit den Virusüberständen der Fusionsprotein-Konstrukte infiziert wurden, konnte demgegenüber eine verstärkte Ansammlung von EGFP im Bereich der Plasmamembran beobachtet werden (Pfeile).

3.5.7 Zellmorphologie

Schwannzellen aus NF2-Tumoren zeigen gegenüber normalen Schwannzellen aus humanen Nervenbiopsien (Kontrollschwannzellen) eine stark veränderte Morphologie, sowie eine fehlende Wachstumsinhibition nach Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Während Kontrollschwannzellen meist bipolar und spindelförmig sind, haben NF2-Schwannzellen oft mehrere, zum Teil sehr lange Ausläufer, die in Lamellopodien- und Filopodien-ähnlichen Ausstülpungen enden und sie bilden *in vitro* Zell-Multilayer (Rosenbaum *et al.*, 1998). Da diese morphologischen Änderungen und der Verlust von Kontaktinhibition mit dem Fehlen eines funktionellen Merlinproteins in NF2-Schwannzellen in Verbindung gebracht wird, wurde die Morphologie von Merlin reexprimierenden NF2-Schwannzellen (LMIEG, LMEG, LEGM) vergleichend mikroskopisch untersucht. Eine Änderung der Morphologie in den Merlin reexprimierenden NF2-Zellen der Tumore NF2.6, NF2.11 und NF2.13 konnte im Vergleich zu uninfizierten bzw. mit dem Kontrollvirus infizierten NF2-Zellen nicht festgestellt werden. Alle Zellen zeigten eine unverändert überwiegend multipolare Morphologie mit langen Ausläufern und wuchsen in mehreren Zellschichten übereinander. Eine Reversion der Zellmorphologie nach der Reexpression des Merlinproteins *in vitro* konnte nicht detektiert werden.

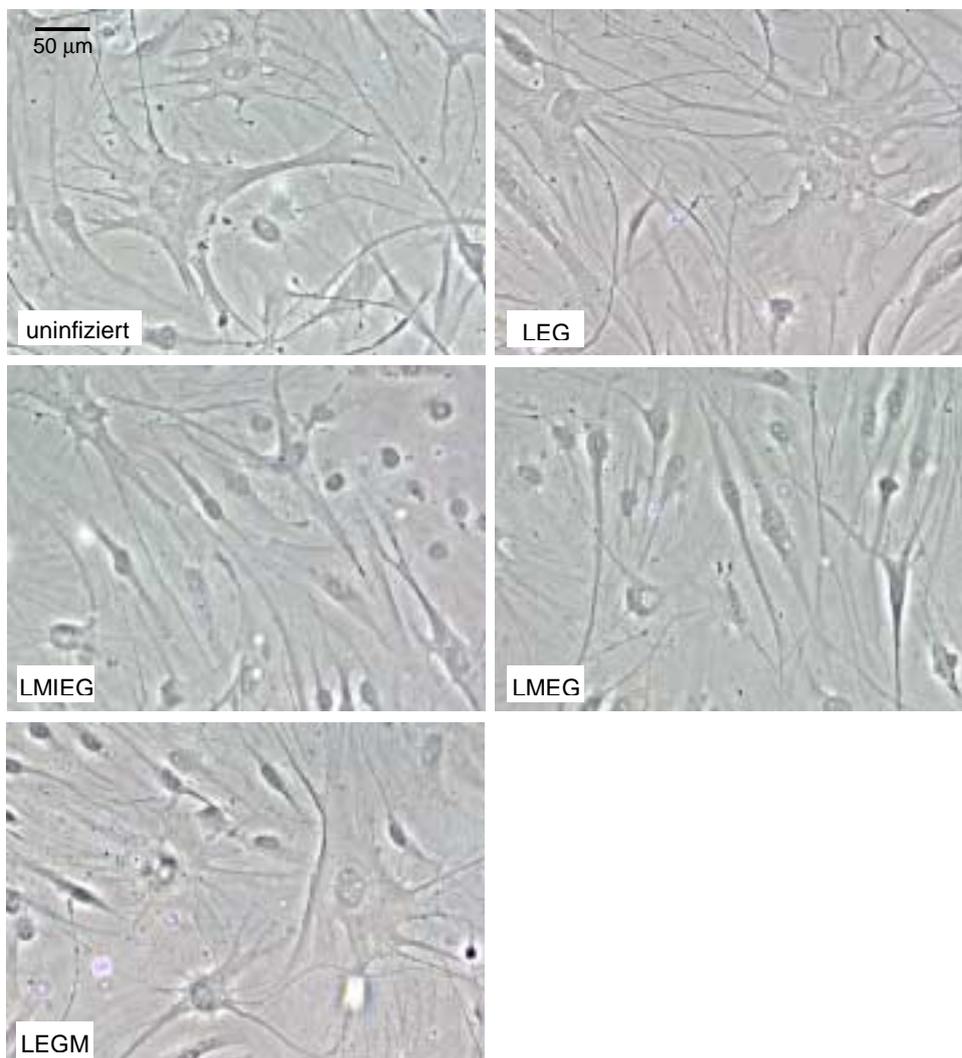


Abb. 25: Repräsentative Darstellung der Morphologie von Merlin reexprimierenden NF2-Schwannzellen

Die Abbildung 25 zeigt exemplarisch für alle untersuchten NF2-Schwannzellen die Morphologie der Schwannomzellen des Tumors NF2.13 in der 2. Passage, 8 Tage nach der Infektion. Die Morphologie uninfizierter bzw. mit dem Kontrollvirus (LEG) infizierter Zellen unterscheidet sich nicht signifikant von der Morphologie Merlin reexprimierender Zellen (LMIEG, LMEG, LEGM).

3.5.8 Actinfärbung

Die Überexpression von Merlin in bestimmten Zelllinien führt über einen bislang noch unbekanntem Mechanismus zu einer Inhibition des Zellwachstums (Lutchmann und Rouleau, 1995; Shermann *et al.*, 1997a; Gutmann *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 1999). Das Merlinprotein zeigt eine hohe Homologie zu den ERM-Proteinen, die als Linker-Moleküle zwischen Plasmamembran und Actinzytoskelett wirken und ist selbst im Bereich kortikaler Actin-Strukturen lokalisiert. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass Merlin eine Regulation des Zellwachstums über Veränderungen im Actinzytoskelett bewirkt (Huynh und Pulst, 1996; Murthy *et al.*, 1998). Obgleich die Reexpression von Merlin in NF2-Schwannzellen im Gegensatz zu Merlin-überexprimierenden HeLa-Zellen zu keinen sichtbaren Veränderungen der Zellmorphologie führte, schien es aufgrund der deutlichen Proliferationsminderung interessant, die Struktur des Actinzytoskeletts auch in diesen Zellen zu untersuchen.

Die Abbildung 26 zeigt exemplarisch für alle untersuchten Schwannomzellen die Anfärbung der NF2.13-Schwannzellen mit Texas Red-gekoppeltem Phalloidin, welches zur Markierung des Actinzytoskeletts eingesetzt wurde. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Struktur der Actinfilamente von uninfizierten und infizierten NF2-Zellen beobachtet werden.

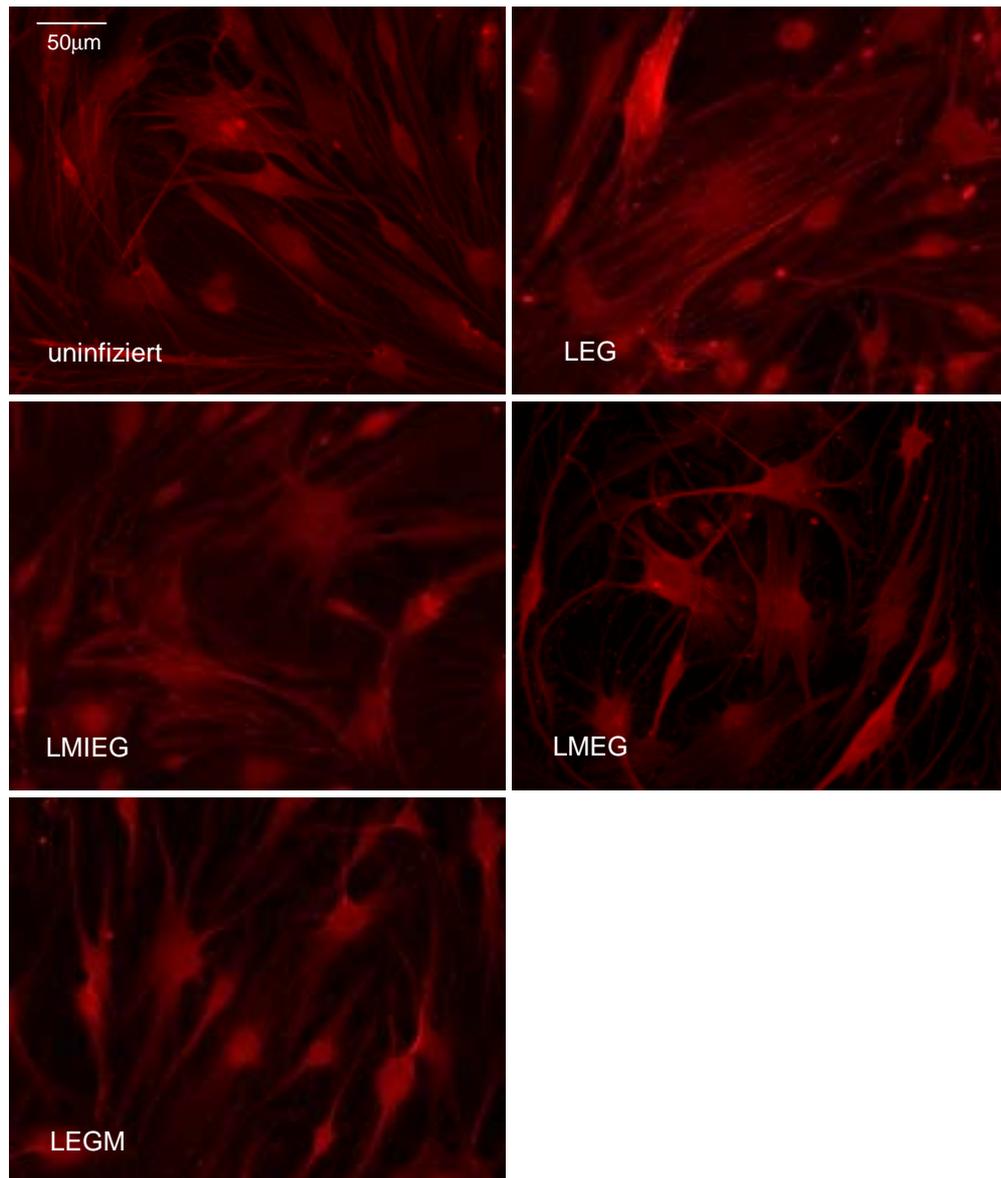


Abb. 26: Actinfärbung von NF2.13-Schwannzellen

NF2.13-Schwannzellen wurden 8 Tage nach der Infektion mit Texas Red-gekoppeltem Phalloidin gefärbt, um mögliche Unterschiede in der Struktur des Actinzytoskeletts zu detektieren. Eine Veränderung des Actinzytoskeletts von Merlin-reexprimierenden Schwannzellen (LMIEG, LMEG, LEGM) gegenüber den Kontrollzellen (uninfizierte Zellen bzw. mit dem Kontrollvirus LEG infizierte Zellen) konnte nicht detektiert werden.

3.5.9 Apoptose

Im Hinblick auf die beobachtete Erhöhung der Apoptoserate in Merlin-überexprimierenden Ratten-Schwannzellen (Herrlich *et al.*, 2000) und die Tatsache, dass das Wachstum von Tumorzellen nicht nur durch eine gesteigerte Proliferation, sondern auch durch eine

verminderte Apoptoserate beeinflusst werden kann, wurde der Anteil apoptotischer Zellen einerseits von Merlin-überexprimierenden NF2-Schwannzellpopulationen und andererseits von NF2-Kontrollzellen untersucht.

Die Schwannomzellen der Tumore NF2.6 und NF2.13 wurden 8 Tage, die des Tumors NF2.11 7 Tage nach Infektionsende mit Hilfe der TUNEL-Färbung untersucht und es wurde der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet.

	NF2.6/1°	NF2.11/2°	NF2.13/2°
uninfiziert	4.1%	7.2%	2.6%
LMIEG	8.8%	14.7%	6.9%
LMEG	3.3%	4.2%	4.8%
LEGM	7.7%	14.0%	8.1%
LEG	-	7.3%	2.8%

Tab. 14: Apoptoseraten infizierter und uninfizierter Schwannomzellen der Tumore NF2.6, NF2.11 und NF2.13

Die Schwannomzellen der Tumore NF2.6, NF2.11 und NF2.13 wurden 7 bzw. 8 Tage nach dem Ende der 3-tägigen Infektion mit der TUNEL-Methode auf den Anteil an apoptotischen Zellen untersucht. LEG-infizierte Zellen des Tumors NF2.6 wurden nicht untersucht.

Interessanterweise zeigte sich bei allen drei untersuchten Tumoren, dass Zellen, die Merlin getrennt von EGFP (LMIEG) oder als EGFP-Merlin-Fusionsprotein (LEGM) exprimierten, gegenüber den Kontrollzellen eine signifikant erhöhte Apoptoserate aufwiesen.

Der Prozentsatz apoptotischer Zellen bei den uninfizierten Zellen betrug 2.6% für die NF2.13-Zellen, 4.1% für die NF2.6-Zellen und 7.2% für die NF2.11-Zellen. Wie aus der Tabelle 14 ersichtlich ist, verursachte die Infektion der NF2-Zellen mit dem Kontrollvirus (LEG) keine Veränderung der jeweiligen Apoptoserate. Jedoch konnte eine tumorspezifische Varianz der mittleren Apoptoseraten beobachtet werden, die sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Mutationen im NF2-Gen oder andere tumorspezifische Besonderheiten erklären lässt. Während die Reexpression des Merlinproteins oder des LEGM-Fusionsproteins in den verschiedenen Tumorzellpopulationen mindestens zu einer Verdoppelung an apoptotischen Zellen führt (Tab. 14), führte die Expression des zweiten Fusionsproteins LMEG nur in Zellen des Tumors NF2.13 (Tab. 14) zu einer leichten Erhöhung der Apoptoserate (im Vergleich zu den NF2.13-Kontrollzellen).

3.5.10 Expressionsanalyse des CD44-Rezeptors

Eine erhöhte Expression des CD44-Rezeptors und die Expression von atypischen CD44-Spleißvarianten ist in vielen Tumorzellen nachweisbar. Aus immunhistochemischen Analysen war bekannt, dass NF2-Tumore im Vergleich zu normalem Gewebe die 3-4-fache Menge Gesamt-CD44 sowie die Spleißvariante CD44v10 exprimieren (Sherman *et al.*, 1997b).

Um zu überprüfen ob dieser Unterschied in der CD44v10-Expression auch zwischen Kulturzellen von NF2-Tumoren und Multiorganspender-Nerven nachweisbar ist, wurden Schwannzellen der Tumore NF2.6, NF2.11 und NF2.13 sowie aus gesunden Kontrollnerven (MOS48, MOS51 und MOS53) mit einem CD44v10-Antikörper immunhistochemisch untersucht. Ein Unterschied in der Expressionsstärke konnte aber nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Schritt wurde anschließend kontrolliert, ob die beschriebene erhöhte Expression von Gesamt-CD44 in Schwannomzellen durch die Reexpression von Merlin beeinflusst werden kann. Für die notwendige Western-Blot-Analyse wurden 15 Tage nach der Infektionsende der NF2.13-Tumorzellen je 50µg Protein aus uninfizierten Zellen, sowie aus den verschiedenen rekombinanten Zellpopulationen der infizierten NF2.13 Schwannomzellen präpariert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Immunfärbung erfolgte mit dem CD44-Antikörper Hermes-3, den auch Sherman und Mitarbeiter (1997) verwendet hatten.

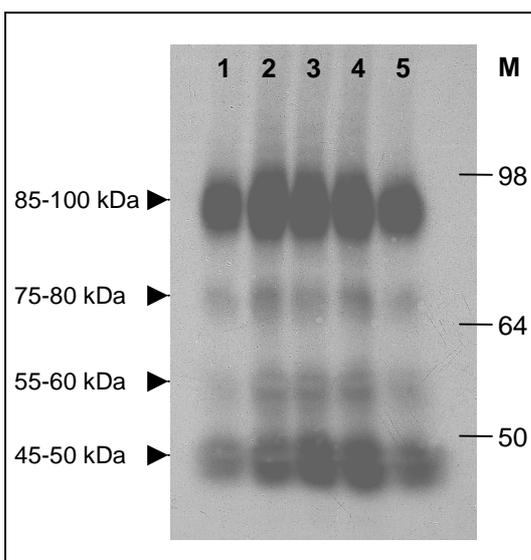


Abb. 27: Expression des CD44-Rezeptors in infizierten und uninfizierten NF2.13-Zellen

Jeweils 50µg Protein aus uninfizierten Zellen (1) und mit den Virusüberständen LEGM (2), LMEG (3), LMIEG (4) bzw. LEG (5) infizierten Zellen wurden in einem 5-10%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem CD44-AK Hermes-3 umgesetzt. M: Molekulargewichtsmarker, Größenangabe in kDa.

Die Western-Blot-Analyse (Abb. 27) zeigt in allen untersuchten Zellpopulationen distinkte Banden im Molekulargewichtsbereich von 85-100 kDa und 75-80 kDa, die glykosylierte CD44-Proteine darstellen. Daneben werden weitere Banden bei 55-60 kDa und 45-50 kDa

detektiert, bei denen es sich um unterglykosylierte CD44-Proteine handelt. Eine verminderte Expression der verschiedenen CD44-Proteinisoformen in Merlin reexprimierenden NF2-Schwanzzellen (Spur 2, 3, 4) konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen (Spur 1, 5) nicht festgestellt werden.

4 DISKUSSION

4.1 Viraler Gentransfer

In der vorliegenden Dissertation wurden die Effekte der rekombinanten Expression des Neurofibromatose 2-Gens *merlin* auf Kulturzellen untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt wurde dabei auf die Untersuchung von Merlinprotein reexprimierenden NF2-Tumorzellen gelegt. Vorversuche mit transienten Transfektionssystemen hatten gezeigt, dass sich humane Schwannomzellen nur mit einer Effizienz von etwa 10% transfizieren lassen. Da eine solche Gentransferrate vermutlich nicht ausreichend ist, um mögliche Veränderungen, die durch die Reexpression von Merlin induziert werden, zu detektieren, wurden weiterführende Experimente mit viralen Vektorsystemen durchgeführt. Zur Auswahl standen verschiedene Virusvektoren, die von AAV- (Adeno-assoziierte Viren) und Retrovirus-Sequenzen abgeleitet waren. Initial wurde das AAV-System bevorzugt, weil AAV-Partikel im Gegensatz zu Retroviren auch nicht-teilungsaktive Zellen infizieren und diese Viren somit für den *in vitro* Gentransfer in schwach proliferierende Zellen, wie beispielsweise humane Schwannzellen, gut geeignet sind (Robbins *et al.*, 1998). Es zeigte sich allerdings, dass mit den verwendeten rekombinanten Adeno-assoziierten Viren nur 2-6% der humanen Schwannzellen infiziert werden konnten (S. Wosch, persönliche Mitteilung), was für die geplanten weiterführenden Untersuchungen ebenfalls nicht ausreichend war. Der weitere Transfer der Merlin-cDNA im Rahmen dieser Arbeit erfolgte daher aufgrund vielversprechender Vorversuche über das retrovirale System.

Retroviren werden schon seit einiger Zeit erfolgreich für den Transfer rekombinanter DNA in Säugetierzellen verwendet, da der Gentransfer im Allgemeinen sehr effizient ist und es durch die Integration der Vektorsequenz ins Genom der Zielzellen zu einer andauernden Fremdgen-Expression kommt (Miller, 1992; Mulligan, 1993). Die heute verwendeten Retrovirusvektoren enthalten neben dem Zielgen nur die Signale für (i) die Verpackung, (ii) die reverse Transkription und (iii) die Integration der einklonierten cDNA sowie Promotor-, Enhancer- und Polyadenylierungssequenzen in den viralen LTRs. Die zusätzlich notwendigen viralen Strukturgene, die die Matrix- und Capsidproteine, die Oberflächenglykoproteine sowie verschiedene Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) kodieren, werden von sogenannten Verpackungszelllinien kodiert. Diese Trennung von cis- und trans-wirkenden viralen Elementen führt zum einen dazu, dass die rekombinanten Retroviruspartikel keine Virusproteine exprimieren, die immunogen wirken könnten. Zum anderen erhöht sich die Sicherheit für den Anwender, da durch die

Minimierung viraler Sequenzen in den rekombinanten Viruspartikeln die Möglichkeit einer Rekombination mit endogenen viralen Sequenzen der Wirtszellen (Retroposons) und damit die Bildung von replikationsfähigen Retroviren verringert wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten Retrovirusvektoren sind Derivate des Maus-Stammzellvirus MSCV 2.1 (Hawley *et al.*, 1994) und enthalten als einzige virale Sequenzen die bereits erwähnten LTRs, die die Expression der Transgene steuern, sowie das Verpackungssignal ψ (Abb.4). Zusätzlich enthalten die Retrovirusvektoren auch die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins EGFP. **EGFP** wurde als Reporterprotein ausgewählt, weil für die Fluoreszenz des Proteins keine exogenen Substrate, Kofaktoren oder zusätzlichen Proteine notwendig sind (Chalfie, 1995) und EGFP ausserdem keine spezifische Lokalisierung innerhalb der Zelle zeigt, wodurch es ein ideales Markerprotein für Lokalisationsstudien mit Fusionsproteinen ist (Marshall *et al.*, 1995). Funktionelles EGFP wurde zudem in verschiedenen Spezies wie z. B. Bakterien (Chalfie *et al.*, 1994), Hefe (Flach *et al.*, 1994), Pflanzen (Baulcombe *et al.*, 1995) und Säugetieren (Marshall *et al.*, 1995) exprimiert, ohne dass es durch die Expression zu einer Beeinträchtigung der Zellen kam (Chalfie, 1995). Die Autofluoreszenz von EGFP wurde benutzt, um den Titer der Virusstöcke, die Gentransfereffizienz und die Lokalisierung von Merlin-EGFP-Fusionsproteinen zu bestimmen, sowie transduzierte Zellen durch Fluoreszenz-aktiviertes-Zellsortieren (FACS) zu isolieren.

Für die Infektion der verschiedenen Primärzellen und Zelllinien (Ausnahme NIH3T3) wurden Virusüberstände auf PG13-Mausfibroblasten-Verpackungszellen hergestellt, die mit dem **Envelope-Protein des Gibbonaffen-Leukämie-Virus** (GALV) pseudotypisiert sind (Miller *et al.*, 1991). Das GALV-Envelope-Protein wurde gewählt, weil es an ein zelluläres Transmembranprotein (Phosphattransporter) bindet, das auf vielen humanen Geweben exprimiert wird (Miller *et al.*, 1994). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass das GALV-Envelope-Protein auch eine gute Infizierbarkeit von humanen Schwannzellen und Schwannomzellen gewährleistet.

Die **Titer der rekombinanten Virusüberstände** wurden per FACS-Analyse durch die Expression des Markerproteins EGFP bestimmt und variierten im Bereich von 0.5×10^6 – 5.0×10^6 transduzierende Partikel pro ml Virusüberstand (TU/ml). In Abhängigkeit von der verwendeten Verpackungszelllinie und der Titrationsmethode erreicht man bei der Herstellung von Retrovirusüberständen i. A. Viruskonzentrationen im Bereich von 1×10^5 bis etwa 1×10^7 TU/ml (Pear *et al.*, 1993; Sena-Estevés *et al.*, 1999). Damit entsprechen die hier erzielten Titer der rekombinanten Virusüberstände den Erwartungen. Der beobachtete Anstieg des Titers von der ersten bis zur vierten Sammlung (Abb.6, 1. - 4.S) entspricht ebenfalls dem Protokoll, da mit zunehmender Dichte der Verpackungszellen über die Zeit mehr Viruspartikel produziert werden.

Auffällig ist der deutliche Titerunterschied zwischen den einzelnen Virusüberständen. Mit dem nur EGFP-exprimierenden Virus (LEG) wurden die höchsten Titer erreicht ($3.1-5.0 \times 10^6$ TU/ml), danach folgen die die EGFP-Fusionsproteine exprimierenden Viren (LMEG und LEGM) mit $1.2-3.4 \times 10^6$ TU/ml und schließlich das LMIEG-Virus, das Merlin und EGFP separat exprimiert, mit einem Titer von $0.5-1.5 \times 10^6$ TU/ml. Da sich die Retroviruskonstrukte nur durch die Größe der inserierten rekombinanten Sequenzen unterscheiden, die Verpackungskapazität für Retroviren (11kb, Spector *et al.*, 1998) aber nicht überschritten wird, gibt es keinen stichhaltigen Hinweis auf eine unterschiedlich effiziente Verpackung der Konstrukte in Viruspartikel, die die beobachteten unterschiedlichen Titerhöhen erklären würden. Die Unterschiede im Titer der verschiedenen Virusüberstände erklären sich vermutlich eher durch die verwendete Titrationsmethode. Die Bestimmung von Virustitern über die Expression des Markers EGFP ermöglicht von der Aussaat der Zellen bis zur FACS Analyse eine Erhebung der Daten innerhalb von 5 Tagen, während andere Methoden, wie beispielsweise die Titration über Antibiotika Resistenzen, deutlich mehr Zeit benötigen. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, daß die Stärke der EGFP-Expression und damit die Intensität der EGFP-Fluoreszenz offensichtlich vom Retroviruskonstrukt abhängig ist. Reine EGFP-Konstrukte exprimieren mehr EGFP pro Zelle als EGFP-Fusionskonstrukte oder IRES-EGFP-Konstrukte, so dass sich wahrscheinlich mehr Zellen oberhalb der FACS-Detektionsgrenze befinden und als EGFP-positiv bewertet werden. Diese Unterschiede in der Expressionsstärke sind wahrscheinlich (i) durch die unterschiedliche Größe der Konstrukte und (ii) eine möglicherweise geringfügig veränderte Konformation von EGFP im Fusionsprotein bedingt. Zudem ist bekannt, dass eine IRES-abhängige Expression schwächer sein kann als eine cap-abhängige Expression der gleichen cDNA (Wagstaff *et al.*, 1998).

Die über die EGFP-Fluoreszenz ermittelten Werte sind daher nicht als absolute Werte zu verstehen, sondern geben die Größenordnung der Virustiter wieder. Das ist ausreichend genau, da die Infektionen der Zielzellen mit einem Verhältnis von Virus zu Zelle von etwa 5 durchgeführt wurden und rekombinante Viren damit in jedem Fall im Überschuss vorhanden waren.

Betrachtet man die **Effizienz der Infektionen** bei den einzelnen Zellarten, so beobachtet man zum einen den schon bei der Bestimmung der Virustiter angesprochenen Effekt, dass die Infektionseffizienz des IRES-EGFP-Konstruktes und der Fusionskonstrukte im Vergleich zum reinen EGFP-Konstrukt niedriger erscheinen. Wie bereits erwähnt, liegt das vor allem an der unterschiedlich starken EGFP-Expression der verschiedenen Konstrukte. Der nur EGFP exprimierende Virus LEG ist somit am besten geeignet, die Infektionseffizienz zu bestimmen.

Es zeigte sich aber, dass die verwendeten rekombinanten Retroviren die verschiedenen Kulturzellen sehr effizient infizieren. Die Infektionsrate der verschiedenen Zelllinien mit dem LEG-Virus liegt bei 80-90% (HeLa-, NIH3T3- und 293 T-Zellen, Tab. 1). Eine solche Infektionsrate durch Retroviren war bei den hier verwendeten proliferationsaktiven Zelllinien zu erwarten (Miller *et al.*, 1990). Aber auch die weniger stark proliferierenden primären Ratten-Schwanzzellen, werden bei dreimaliger Infektion über je 4h durch den LEG-Retrovirus noch mit einer Effizienz von ca. 50% infiziert (Tab. 1). Selbst mit den humanen Schwanzzellen (NF2- und MOS-Schwanzzellen) wurden Infektionsraten von 50% bis fast 60% (Tab. 9 und 10) erreicht.

Diese hohe Infektionsrate der primären Zellen durch die verschiedenen Retrovirus-Konstrukte wird (i) durch das verwendete Envelope-Protein und (ii) durch die gewählten Infektionsbedingungen bewirkt. Die Wahl des Envelope-Proteins ist sehr entscheidend, da Retroviren durch die Interaktion des viralen Envelope-Proteins mit einem oder mehreren Rezeptoren der Wirtszelle von dieser aufgenommen werden (Weiss und Taylor, 1995). Damit wird durch das Envelope-Protein nicht nur die Zellspezifität bestimmt, sondern zum Teil – abhängig von der Expressionsstärke des zellulären Rezeptors auf der Wirtszelle – auch die Infektionseffizienz (Miller, 1996). Die Vorüberlegung, eine das GALV-Envelope-Protein exprimierende Verpackungszelllinie zu verwenden, hat sich damit als effektiv herausgestellt.

Die Bedingungen unter denen die *in vitro*-Infektion durchgeführt werden, sind insbesondere bei der Verwendung von Primärzellen entscheidend für die erzielbare Infektionsrate. Stark proliferierende Zelllinien lassen sich i. A. auch ohne besondere Medienzusätze und oft durch nur einmalige Inkubation mit Virusüberstand (NIH3T3- und 293 T-Zellen) effizient infizieren (Tab. 1). Demgegenüber haben die Versuche mit humanen Schwanzzellen gezeigt, dass sich die Infektionsrate dieser primären Zellen deutlich dadurch verbessern lässt, dass man auch dem Infektionsmedium alle für die Langzeit-Kultivierung notwendigen Substanzen (MIX) zufügt (Tab. 9). Diese so erzielte Verbesserung der Infektionsrate war erstaunlicherweise auch schon bei kurzen Infektionszeiträumen von 5h zu beobachten (Tab. 9). Offensichtlich ist es auf jeden Fall notwendig, humane Schwanzzellen unter optimalen Bedingungen zu kultivieren, da die Zellen sonst schon nach sehr kurzer Zeit ihre Proliferationsaktivität einstellen. Längere Infektionszeiten (24-72h), durch die sich die Möglichkeit erhöht, dass ein Virus auf eine proliferierende Schwanzzelle trifft, waren per se nur durch den Zusatz des Komplett-Mixes möglich. Für zukünftige Experimente könnte eine weitere Optimierung der Infektionseffizienz darin bestehen, dass man bei Langzeit-Infektionen über 72h einen mehrmaligen Wechsel der Virusüberstände vornimmt. Denn aufgrund der geringen Halbwertszeit der Retroviren von 5.5-7.5h (Andreadis *et al.*, 1997), erhöht sich dadurch die Wahrscheinlichkeit für das Zusammentreffen eines virulenten Virus mit einer proliferierenden Zelle (Palsson und Andreadis, 1997).

Die Infektion der Zielzellen mit rekombinanten Retroviren und die andauernde Expression der rekombinanten Proteine war durch die Autofluoreszenz des Reporterproteins EGFP leicht detektierbar. Zusätzlich wurde an infizierten HeLa-Zellen exemplarisch die Integration der Proviren ins Genom der Wirtszellen überprüft. Die etwa zehn Zellpassagen nach der Infektion durchgeführten PCR-Analysen (Abb. 7) bestätigten eine stabile Integration der rekombinanten Proviren von allen untersuchten Konstrukten. Des Weiteren wurde zur Validierung der verschiedenen Retroviruskonstrukte auch die Expression des rekombinanten Merlinproteins in HeLa-Zellen (Abb. 13), in NIH3T3-Zellen (Abb. 18) und NF2.13-Zellen (Abb. 20) über Western Blot-Analysen bestimmt. Dabei konnte sowohl die Expression der Merlin-EGFP-Fusionsproteine bei 100 bzw. 102 kDa, als auch die Expression des Merlinproteins vom Merlin-IRES-EGFP-Konstrukt bei etwa 72 kDa in allen infizierten Zelltypen detektiert werden. Endogenes Merlinprotein konnte in HeLa-Zellen (Abb. 13 B und C), nicht aber in NIH3T3- und NF2.13-Zellen nachgewiesen werden. Auch Lutchmann und Rouleau (1995) haben eine entsprechende endogene Merlin-Expression in NIH3T3-Zellen nicht beobachten können. Zur Halbwertszeit und damit Nachweisbarkeit von mutierten Merlinproteinen ist aus Pulse-chase-Experimenten von Gutmann und Mitarbeitern (1998) bekannt, dass Wildtyp-Merlinprotein eine Halbwertszeit von ca. 20h hat, während Merlinproteine mit *missense*-Mutationen nach 15-17h abgebaut werden. Merlinproteine mit anderen Mutationen wurden nicht untersucht. Ein fehlender Nachweis von endogenem Merlinprotein in NF2.13-Schwanzzellen (Abb. 20) könnte daher darauf zurückzuführen sein, dass die Rasterschubmutation im Exon 8 des Merlings dieser Zellen aufgrund der größeren Veränderung des Proteins zu einer deutlich reduzierten Halbwertszeit führt, die einen Nachweis im Western Blot nicht mehr zulässt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verwendeten Retroviren, die nur ins Genom mitotisch aktiver Zellen integrieren (Roe *et al.*, 1993) unter optimalen Infektionsbedingungen und durch die Verwendung eines geeigneten Envelope-Proteins auch für den Gentransfer in schwach proliferierende humane Schwanzzellen geeignet sind. Das Reporterprotein EGFP ist gut geeignet um die dauerhafte Expression eines Transgens zu verfolgen und - mit den bereits erwähnten Einschränkungen - auch den Titer von Retrovirusstöcken sowie die Gentransfereffizienz zu bestimmen.

4.2 Proliferation

Tumorsuppressorgene sind definitionsgemäß solche Gene, bei denen der Ausfall *beider* Allele in einer Zelle durch Mutationen zur Bildung eines Tumors führt („two hit“-Model der Tumorentwicklung, Knudson, 1991).

Die bisher bekannten Tumorsuppressorproteine üben verschiedenste Funktionen in der Zelle aus (Knudson, 1993; Lutchman und Rouleau, 1996). Das Retinoblastomprotein, das bei Inaktivierung zu Gliomen der Retina führt und das p53-Protein, das mit dem Li Fraumeni-Syndrom assoziiert ist, spielen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Kontrolle des Zellzyklusses als auch bei der Regulation der Apoptose. Das Neurofibromin-Gen, das Krankheitsgen der Neurofibromatose 1 hingegen, kodiert ein GTPase aktivierendes Protein, das an der Ras-Signaltransduktion beteiligt ist. Weitere wichtige Tumorsuppressoren sind beispielsweise das APC-Protein (familiäre adenomatöse Polyposis coli), das bei Zell-Zell-Interaktionen mitwirkt und das Zinkfinger-Protein WT1 (Wilm's Tumor), das die Transkription beeinflusst.

Das NF2-Protein Merlin ist der erste beschriebene Tumorsuppressor der, basierend auf seiner Homologie zu den Mitgliedern der Band 4.1-Proteinfamilie, möglicherweise eine Funktion als molekularer Linker zwischen der Plasmamembran und dem Actinzytoskelett ausübt. Die genaue zelluläre Funktion von Merlin und der Wirkungsmechanismus seiner Tumorsuppressor Aktivität sind aber noch weitgehend ungeklärt. Bezüglich der Wirkung von Merlin auf die Proliferation von Zellen ist aus Arbeiten von Lutchman und Rouleau (1995) bekannt, dass die Überexpression von Merlin in hochkonfluenten NIH3T3-Zellkulturen zu einer Wachstumsinhibition führt. Auch eine Überexpression in transformierten RT4- oder JS1-Ratten-Schwanzzelllinien wirkt proliferationsenkend (Shermann *et al.*, 1997a). Untersuchungen des Proliferationsverhaltens von primären humanen Schwanzzellen, den Zellen in denen der Ausfall beider Merlin-Allele zur Tumorentwicklung führt, sind bisher kaum durchgeführt worden. Daten von Pelton *et al.* (1998) und Rosenbaum *et al.* (1998) zeigten, dass NF2-Tumorzellen gegenüber normalen Schwanzzellen aus Nervenbiopsien häufig eine erhöhte basale Proliferationsrate aufweisen. Die Zellen können zudem über einen kurzen Zeitraum ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert werden, was auf ein endogenes Proliferationspotential der NF2-Tumorzellen schließen lässt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Merlin-Expression u. a. auf das Proliferationsverhalten in verschiedenen Zelltypen *in vitro* zu untersuchen. Von besonderem Interesse waren dabei die Untersuchungen an NF2-Schwanzzellen, die aus humanen Neurofibromatose 2-Tumoren isoliert wurden. Dabei interessierte natürlich vor allem, ob durch eine Reexpression von Merlin in den NF2-Tumorzellen, die oftmals erhöhte Proliferationsrate dieser Zellen beeinflusst werden kann.

Erste Experimente zu möglichen Auswirkungen einer Überexpression von Merlin auf die Proliferation von Kulturzellen wurden an **HeLa-, NIH3T3-, und 293 T-Zellen sowie an primären Ratten-Schwanzzellen** durchgeführt. Weder in HeLa-Zellen, noch in NIH3T3-Zellen, 293 T-Zellen oder Ratten-Schwanzzellen war ein signifikanter Effekt der zusätzlichen Merlin-Expression auf das Proliferationsverhalten unter den gewählten Kulturbedingungen erkennbar.

Infizierte HeLa-Zellen wurden dreimal unabhängig voneinander untersucht, ohne dass ein Unterschied in der Proliferationsrate zwischen Merlin-überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen festgestellt werden konnte. Offensichtlich hat die Überexpression von Merlin in HeLa-Zellen, die eine schwache endogene Merlin-Expression aufweisen (Abb. 13), keinen Effekt auf die Zellteilung. Dieses Ergebnis kann nicht durch eine zu geringe Anzahl Merlin-überexprimierender Zellen in den untersuchten Zellpopulationen erklärt werden, weil 64-80% der untersuchten Zellen EGFP und damit auch Merlin exprimierten. Da zwischen dem Infektionsende und den verschiedenen Messungen zur Proliferation ein Zeitraum von 3-24 Tagen lag, ist auch ein unzureichend langer Merlin-Expressionszeitraum als Erklärung unwahrscheinlich.

Für die Proliferationsaktivität der untersuchten NIH3T3- und 293 T-Zellen sowie für die Ratten-Schwanzzellen nach rekombinanter Merlin-Expression gilt ähnliches. Die NIH3T3-Zellen wurden zweimal unabhängig voneinander untersucht, 293 T-Zellen und Ratten-Schwanzzellen je einmal, ohne dass ein Effekt der Merlin-Überexpression auf die Proliferation detektiert wurde. Ein fehlender Effekt der Merlin-Expression auf die Zellteilung von primären Ratten-Schwanzzellen ist in der Zwischenzeit auch von Herrlich *et al.* (2000) beobachtet worden. Die Infektionseffizienzen aller in der vorliegenden Studie verwendeten Zellen wurden über die EGFP-Expression bestimmt und waren mit Ausnahme der mit dem LMIEG-Konstrukt infizierten Ratten-Schwanzzellen (15%) und 293 T-Zellen (20%) ebenfalls sehr gut.

Um zu überprüfen, ob ein Effekt von Merlin auf die Proliferation von kultivierten Zellen möglicherweise erst detektierbar ist, wenn *alle* untersuchten Zellen Merlin überexprimieren, wurden von den bereits infizierten HeLa- und NIH3T3-Zellkulturen über die Sortierapparatur eines FACS-Gerätes bzw. durch Einzelzellklonierung solche rekombinanten Zellen separiert, die stabil EGFP und Merlin exprimierten. Anschließend wurden die Proliferationsraten dieser zu fast 100% Merlin-überexprimierenden Zellpräparationen (i) unter konfluenten Kulturbedingungen und (ii) nach Serumentzug bestimmt. Konfluente Kulturbedingungen wurden als Versuchsparameter gewählt, weil die von Lutchman und Rouleau (1995) beschriebene Proliferationsminderung nur in Merlin-überexprimierenden NIH3T3-Zellen unter hochkonfluenten Bedingungen beobachtet wurde. Daten von Shaw *et al.* (1998a), die gezeigt hatten, dass die Expression von Merlin nach Serumentzug ansteigt, nicht aber nach Zusatz anderer Zellzyklus arretierender Substanzen, begründeten den zweiten Versuchsansatz.

Überraschenderweise war in den zu **100% Merlin-überexprimierenden HeLa-Zellklonen** bei Kulturen mit etwa 85% und 95% Konfluenz, sowie nach 24stündigem Serumentzug eine unerwartete Steigerung der Proliferationsrate zu beobachten. Merlin-überexprimierende Zellen traten sowohl bei Konfluenz, als auch nach Serumentzug verstärkt in den Zellzyklus ein, was an den erniedrigten Zellzahlen in der G₀/G₁-Phase und den erhöhten Zellzahlen in der S-Phase deutlich wird (Tab. 3, 4, 5, 6). Dieser Anstieg an Zellen in der S-Phase des Zellzyklusses ist in allen durchgeführten Experimenten statistisch signifikant ($p < 0.02$, *Student's t Test*). Eine mögliche Erklärung für die unerwartete proliferationssteigernde Wirkung in HeLa-Zellen könnte im Fehlen von distinkten Interaktionspartnern liegen, wie sie für die korrekte Funktion von Merlin in Schwanzzellen notwendig sind.

Merlin wird zwar in vielen Körperzellen exprimiert, eine physiologische Funktion des Proteins wird aber nach bisherigem Wissen nur in Schwanzzellen und anderen Gliazellen, sowie meningealen Zellen und embryonalen Geweben während der Mausentwicklung ausgeübt (Dilys *et al.*, 1996; Gutmann *et al.*, 1997; McClatchey *et al.*, 1997). HeLa-Zellen sind somit möglicherweise keine „Zielzellen“ des Proteins und exprimieren daher notwendige Interaktionspartner des Merlin-Tumorsuppressors nicht, oder nicht in ausreichender Menge. Zudem handelt es sich bei HeLa-Zellen um transformierte/immortalisierte Tumorzellen, in denen die normalen Regulationswege für die Zellproliferation verändert sind.

Auch wenn das Ergebnis nicht den Erwartungen entspricht, so belegt es doch offensichtlich einen bislang unbekanntem Zusammenhang zwischen der Menge an exprimiertem Merlinprotein und dem Proliferationsverhalten von HeLa-Zellen. Diese Wechselwirkung ist aber nur unter bestimmten Zellkulturbedingungen detektierbar.

Die Bestimmung der Proliferationsaktivität der **stabil Merlin-überexprimierenden NIH3T3-Zellklone** erfolgte bei konfluenter und subkonfluenter Zelldichte. Dabei konnte anders als bei Lutchman und Rouleau (1995) beschrieben, kein Effekt von Merlin auf das Proliferationsverhalten von konfluenten NIH3T3-Zellen festgestellt werden (Tab. 8). Auch in subkonfluenten Kulturen war keine Proliferationsänderung detektierbar (Tab. 7), obwohl alle Daten zum Proliferationsverhalten an reinen EGFP- und damit auch Merlin-exprimierenden Zellpopulationen erhoben wurden. Diese Ergebnisse sind ebenfalls statistisch signifikant. Die Diskrepanz zu den beschriebenen Daten ist höchstwahrscheinlich durch die unterschiedlichen Methoden begründet, die verwendet wurden um Proliferationsaktivität zu bestimmen. Lutchman und Rouleau ermittelten die Proliferationsaktivität der hochkonfluenten NIH3T3-Zellen, indem sie über einen Zeitraum von fünf Tagen alle 24 Stunden die Zellzahl manuell auszählten. Diese Methode hat zwar den Vorteil, dass auch sehr kleine Proliferationsunterschiede durch das exponentielle Wachstum der Zellen nach einigen Tagen detektierbar werden, andererseits führen geringe Unterschiede bei der Aussaat der verschiedenen Zellpopulationen aus dem gleichen Grund zu deutlichen

Zellzahlunterschieden. Ein weiterer kritischer Aspekt an diesem experimentellen Ansatz ist, dass über einen Zeitraum von fünf Tagen die Proliferationsaktivität hochkonfluenten NIH3T3-Zellen bestimmt wird, obwohl NIH3T3-Zellen stark kontaktinhibiert sind und das Wachstum bei Zell-Zell-Kontakten schnell einstellen.

Die Daten zum Proliferationsverhalten der NIH3T3-Zellkulturen nach rekombinanter Merlin-Expression wurden abweichend von den zuvor untersuchten Zellen (z.B. HeLa-Zellen) nicht durch Einbau des Thymidin-Analogons BrdU (Bromdesoxyuridin) und nachfolgender Immunfärbung mit einem anti-BrdU-Antikörper ermittelt. Um eine andere, etablierte und weniger zeitaufwendige Methode der Zellzyklusanalyse zu testen, wurde die DNA der NIH3T3-Zellen mit Propidiumjodid angefärbt. Die verschiedenen Zellzyklusphasen wurden dann aufgrund der Abhängigkeit von der jeweiligen Phase unterschiedlichen DNA-Gehaltes der Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Streuung der ermittelten Proliferationswerte (Anteil der Zellen in der S-Phase des Zellzyklusses) bei einer Auswertung über zwei Messparameter (DNA-Gehalt und BrdU-Einbau, Abb. 8) geringer ist, als bei einer Auswertung, die nur auf einem Messparameter, nämlich dem DNA-Gehalt der Zellen basiert (Abb. 19). Um auch geringe Unterschiede in den Proliferationsraten von Merlin-reexprimierenden und von nicht reexprimierenden NF2-Zellen detektieren zu können, wurden deshalb alle nachfolgenden Proliferationsmessungen an NF2-Zellen mittels BrdU-Einbau und Immunfärbung durchgeführt.

Das NF2-Gen gilt im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern der ERM-Proteinfamilie als Krankheitsgen für die erbliche Tumorerkrankung Neurofibromatose Typ2 (NF2), bei der mehr als 90% der Patienten bilaterale vestibuläre Schwannome entwickeln (Evans *et al.*, 1992; Rouleau *et al.*, 1993; Trofatter *et al.*, 1993). Da mit diesen Tumoren eine durch Mutation im NF2-Gen bedingte Inaktivierung des Merlin-Genproduktes assoziiert ist (Rouleau *et al.*, 1993; Trofatter *et al.*, 1993), wird vermutet, dass es sich bei Merlin um einen Tumorsuppressor handelt (Knudsen, 1993). Zwar konnte in der Zwischenzeit tatsächlich gezeigt werden, dass die Proliferation von kultivierten NF2-Schwannomzellen, bei denen beide Allele des NF2-Gens verändert sind, gegenüber humanen Kontrollschwanzellen in vielen Fällen verändert ist (Pelton *et al.*, 1998; Rosenbaum *et al.*, 1998). Darüber hinaus aber werden nahezu alle Experimente zur Charakterisierung der Merlin-Funktion ausschließlich an etablierten Zellkultur-Modellsystemen, wie z.B. Cos-Zellen (Den Bakker *et al.*, 1995), Schwannzelllinien (Huynh und Pulst, 1996; Sherman *et al.*, 1997) oder Fibroblasten (Lutchman und Rouleau, 1995; Gonzalez-Agosti *et al.*, 1996; Schmucker *et al.*, 1996) durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wird nun erstmals an kultivierten **humanen Schwannomzellen**, welche zuvor aus NF2-Tumoren präpariert worden waren, untersucht, ob eine rekombinante Reexpression des aktiven Merlinproteins (Isoform I; Meng *et al.*, 2000) in diesen Tumorzellen

zu einer Reversion des oftmals aberranten Proliferationsverhalten führt. Die Untersuchungen wurden an NF2-Zellen aus drei verschiedenen Tumoren mit jeweils unterschiedlichen Mutationen in der Keimbahn und im Soma durchgeführt. Durch diese Unterschiede war gewährleistet allgemeine, sowie Patienten- und/oder Mutations-spezifische Effekte der Merlin-Reexpression zu detektieren. Um darüber hinaus der *in vivo*-Ausgangssituation im Tumor möglichst nahekommen und experimentell bedingte zelluläre Veränderungen zu minimieren, wurden für die Untersuchungen an den NF2-Zellen nur Kulturen sehr früher Zellpassagen (NF2.6: erste Passage; NF2.11 und NF2.13: zweite Passage) verwendet. Tatsächlich führte die retroviral vermittelte Reexpression des intakten Merlinproteins in den NF2-Zellen aller untersuchten Tumore zu einer deutlichen Verringerung der Proliferationsrate (Tab. 11, 12 und 13). Dieser generelle, negative Einfluss von Merlin auf die Teilungsaktivität der Tumorzellen ist unabhängig von den vorliegenden Mutationen im NF2-Gen und entspricht in seiner Wirkungsweise der Funktion eines Tumorsuppressors, wie sie Merlin zugeschrieben wird (Tab. 15).

Tumor	Proliferationssenkung auf x-Prozent der Kontrollzellen	Anteil EGFP exprimierender Zellen
NF2.6	~ 70 – 75 %	~ 35 – 47 %
NF2.11	~ 88 %	~ 19 – 25 %
NF2.13	~ 55 – 69 %	~ 29 – 35 %

Tab. 15: Infektionseffizienz und Proliferationssenkung in NF2-Tumorzellen

Aufgelistet sind die Infektionseffizienzen (gemessen als Anteil EGFP-exprimierender Zellen an der Gesamtzellzahl) und die Proliferationsminderung (%-Proliferation bezogen auf den als 100% gesetzten Anteil der Kontrollzellen) der verschiedenen Merlin-reexprimierenden NF2-Tumorzellen.

Die ermittelten Daten zur Teilungsaktivität der infizierten NF2-Zellen zeigen, dass es mit jedem getesteten Merlinkonstrukt, unabhängig vom Vorliegen einer Proteinfusion mit EGFP, zu einer verstärkten Arretierung der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklusses kommt (Tab. 11-13). Dadurch treten die Merlin-reexprimierenden Zellen im Vergleich zu den uninfizierten und den mit dem EGFP-Kontrollkonstrukt infizierten Zellen verlangsamt in den Zellzyklus ein, was an der verringerten Anzahl von Zellen in der S-Phase erkennbar ist (Tab. 11-13). Eine solche Verminderung von Zellen in der S-Phase und Zunahme der Zellzahl in der G₁-Phase des Zellzyklusses durch die Überexpression von rekombinantem Merlinprotein, wurde kürzlich auch in Kulturen von RT4-D6P2T-Ratten-Schwannomazellen festgestellt (Morrison *et al.*, 2001).

Der deutlichste proliferations-senkende Effekt der Merlin-Reexpression war in den infizierten NF2.13 Zellen messbar, welche nur noch Zellteilungs-raten zwischen 55% und 69% (je nach verwendetem Merlinkonstrukt) bezogen auf die basale Teilungsrate der uninfizierten Kontrollzellen (Tab. 13 und 15) aufwiesen. Eine Reexpression von Merlin in den NF2-Zellen der beiden anderen Tumore bewirkte den gleichen qualitativen Effekt der Proliferationsminderung, wobei jedoch die effektive Absenkung auf 70–75% (NF2.6; Tab. 11) bzw. auf ca. 88% (NF2.11; Tab. 12) der Teilungsrate der jeweiligen Kontrollzellen geringer ausfiel. Ein Vergleich des erzielten Effektes der Proliferations-senkung mit der jeweiligen Infektionsrate der verschiedenen Zellpopulationen (Anteil EGFP-exprimierender Zellen; Tab. 15) zeigt deutlich, dass die Absenkung im Allgemeinen nicht mit der Infektionseffizienz korreliert. Zwar zeigten die NF2.11 Zellen sowohl die geringste Änderung ihres Zellteilungsverhaltens, als auch die schlechteste Infektionseffizienz, jedoch wurden auf der anderen Seite die NF2.13 Zellen, die den größten Effekt der Merlin-Reexpression auf die Zellproliferation zeigten nicht am effizientesten infiziert. Man muss deshalb vermuten, dass die beobachtete unterschiedlich starke Wirkung der rekombinanten Merlin-Reexpression auf die Proliferation der NF2-Zellen tumor- bzw. kulturspezifisch ist. Die Unterschiede der basalen Proliferationsaktivität, die bei den untersuchten kultivierten NF2-Schwannomzellen beobachtet wurden (Tab. 11-13) belegen die Varianz zwischen kultivierten NF2-Zellen verschiedener Tumore, wie sie auch bereits vorher beobachtet wurde (Pelton *et al.*, 1998; und Rosenbaum *et al.*, 1998). Es wäre im Rahmen weiterführender zukünftiger Studien deshalb sinnvoll, an einer größeren Anzahl von Tumoren zu untersuchen, in wie weit die Art der unterschiedlichen Merlin-Mutationen in NF2-Tumoren die Zellteilung der Schwannomzellen beeinflusst, oder ob die beobachtete Varianz in den kultivierten Zellen lediglich eine Folge der Gewinnung und Präparation der Kulturzellen aus dem Tumormaterial darstellt. Sollte die Art der Mutation des Merlinproteins einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten besitzen, so wäre damit möglicherweise auch die unterschiedlich starke Wirkung der Reexpression von Merlin zu erklären.

Merlin wurde bereits vor einigen Jahren die Funktion eines Tumorsuppressors zugewiesen (Knudsen *et al.*, 1993; Rouleau *et al.*, 1993; Trofatter *et al.*, 1993) und es wurde gezeigt, dass die Überexpression von Merlin das Wachstum von normalen (Lutchman und Rouleau, 1995) oder HA-ras-transformierten 3T3-Fibroblasten (Tikoo *et al.*, 1994) unter bestimmten Kulturbedingungen beeinflussen kann. Sherman und Mitarbeiter (1997) sowie Herrlich *et al.* (2000) beschreiben darüber hinaus Effekte einer induzierbaren Merlin-Überexpression in chemisch transformierten Ratten-Schwannomzellen (RT4-D6P2T), welche einen konstitutiv aktiven Wachstumsfaktor-Rezeptor (ErbB2) exprimieren. Tatsächlich wurde *in vivo* die Wachstumsrate von durch RT4-D6P2T-Zelltransplantate ausgelösten Tumoren nach Merlin-Induktion reduziert (Sherman *et al.*, 1997) und *in vitro* sank die Anzahl an Kolonien dieser Zellen in Softagar nach Merlin-Expression auf ca. 40% (Herrlich *et al.*, 2000). Unerwartet

erscheint deshalb die Beobachtung, dass die Induktion von Merlin in RT4-D6P2T-Zellen, die in Suspensionskulturen oder adhäsiven Plattenkulturen gehalten wurden, nur dann zu einer Reduzierung der Proliferation führte, wenn die Zellen den Status der Konfluenz und damit Zellkontakt erreicht hatten (Herrlich *et al.* 2000). Die hier vorliegenden Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von NF2-Schwannomzellen nehmen in diesem Zusammenhang eine besondere Position ein, denn sie zeigen erstmals einen direkten Effekt der Merlin Expression auf humane NF2-Schwannomzellen, bei denen zudem eindeutig Mutationen im NF2-Gen als Ursache des Tumorwachstums bestimmt worden sind und belegen darüber hinaus, dass die Überexpression von Merlin auch unter nicht konfluenten Kulturbedingungen eine Hemmung des Zellwachstums bewirken kann. Die oben genannte Beobachtung, dass Merlin in RT4-Schwannomzellen unter bestimmten konfluenten Kulturbedingungen deren Wachstum reguliert, deutet daraufhin, dass ein von dem konstitutiv aktiven ErbB2-Rezeptor induzierter Signalweg vom NF2-Genprodukt Merlin nachträglich beeinflusst werden kann, sofern die Merlin-Funktion in diesen Zellen z.B. durch Zellkontakt aktiviert wurde. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass die wachstumsregulierende Wirkung von Merlin möglicherweise eine zytoskelettassoziierte Komponente benötigt.

Eine statistische Auswertung der vorliegenden NF2-Proliferationsdaten war leider nicht möglich, da aufgrund des begrenzten Tumormaterials nur jeweils zwei unabhängige Experimente pro Tumor und getestetem viralen Merlin-Konstrukt durchgeführt werden konnten.

4.3 Apoptose

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem untersucht, ob die Reexpression von Merlin in NF2-Tumorzellen bzw. die Überexpression von Merlin in HeLa-Zellen einen Effekt auf die Apoptoserate der jeweiligen Zellen hat. Diese Untersuchungen waren folgendermaßen veranlasst. Zum einen beruht die Fähigkeit von Tumorzellpopulationen zu expandieren nicht allein auf einer Wachstumsfaktor unabhängigen Proliferation bzw. einer Insensitivität gegenüber antiproliferativen Signalen. Viele, möglicherweise alle, Tumorzellen entwickeln darüber hinaus auch eine Resistenz gegenüber Apoptose induzierenden Signalen (Lundberg und Weinberg, 1999; Hanahan und Weinberg, 2000). Zum anderen weisen Ergebnisse verschiedener Studien auf eine direkte Funktion von Zytoskelett und Zytoskelett-assoziierten Proteinen bei der Regulation von Apoptose hin. So kann z. B. in CMK-7 Zellen durch die Zerstörung des Actinzytoskeletts durch Zytocalasin D, das die Polymerisierung von

Actinfilamenten hemmt, experimentell Apoptose induziert werden (Yamazaki *et al.*, 2000). In Epithelzellen verhindert die Überexpression von β -Catenin, das als Adaptorprotein zwischen Cadherin und dem Actinzytoskelett wirkt, Apoptose (Orford *et al.*, 1999). Dem gegenüber induziert mutiertes Ezrin, ein weiterer Adaptor zwischen Plasmamembranproteinen und dem Actinzytoskelett und wie Merlin ein Mitglied der ERM-Proteinfamilie, Apoptose in Epithelzellen (Gautreau *et al.*, 1999). Auch von Proteinen, die an der Bildung von Fokalkontakten, den Verbindungsstellen zwischen Plasmamembran und der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt sind, ist eine Apoptose regulierende Wirkung bekannt. Die Kinase FAK (focal adhesion tyrosin kinase) beispielsweise unterdrückt die p53-gesteuerte Apoptose in primären RS-Fibroblasten (Ilic *et al.*, 1998). Eine andere Studie belegt, dass das Adaptorprotein p130cas, das zum Integrin-Signalweg gehört, ebenfalls an diesem Prozess beteiligt ist (Almeida *et al.*, 2000).

Aufgrund der postulierten Tumorsuppressor-Funktion von Merlin war für die geplanten Experimente an HeLa- und NF2-Zellen zu erwarten, dass das Merlinprotein, sofern es die Apoptoserate dieser Zellen beeinflusst, einen Apoptose stimulierenden Effekt hat. Ein entsprechender Effekt war kürzlich für kultivierte primäre Ratten-Schwanzzellen beschrieben worden, bei denen die Überexpression von Merlin zu einer Erhöhung der Apoptoserate führte (Herrlich *et al.*, 2000). In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten HeLa-Zellkulturen konnte dieser Apoptose-induzierende Effekt von Merlin jedoch nicht beobachtet werden (3.4.1.6). Nach der TUNEL-Färbung war mit Ausnahme der mit dem LMIEG-Virus infizierten Zellen, die eine sehr geringe Apoptoserate von $<0.2\%$ zeigten, sowohl in den verschiedenen Merlin-überexprimierenden als auch in den uninfizierten HeLa-Zellkulturen keine apoptotischen Zellen nachweisbar. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit jüngeren Untersuchungen von Ikeda *et al.* (1999), die in Merlin-überexprimierenden humanen Meningeoma-Zellen ebenfalls keinen Einfluss der Merlin-Expression auf die Apoptose beobachten konnten.

Fehlende Apoptose in Tumorzellen wie HeLa-Linien ist wie eingangs erwähnt nicht ungewöhnlich. In der Literatur sind für HeLa-Kulturen durchschnittliche Apoptoseraten von 2-5% beschrieben (Skladanowski und Konopa, 1993; Wang *et al.*, 2000; Seol *et al.*, 2001). Diese Raten sind jedoch stark von der verwendeten Nachweismethode der Apoptose abhängig. In den zitierten Untersuchungen wurden die apoptotischen Zellen aufgrund von morphologischen Veränderungen, wie dem Abrunden der Zellen auf der Kulturschale (Seol *et al.*, 2001), dem Schrumpfen der Zellen (Skladanowski und Konopa, 1993) oder der Kondensation der Zellkerne (Wang *et al.*, 2000) detektiert. Da es sich dabei um Auswertemethoden mit einer relativ großen subjektiven Komponente handelt und darüber hinaus die gewählten Kulturbedingungen einen großen Einfluss auf die Viabilität von Zellen

haben, stehen diese Daten nicht in Widerspruch zu der hier ermittelten geringeren Apoptoserate der untersuchten HeLa-Zellen.

Untersuchungen zur Apoptoserate von NF2-Tumorzellen *in vivo* oder *in vitro* sind bisher noch nicht durchgeführt worden, so dass die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Experimente an kultivierten NF2-Schwannzellen erstmals den Einfluss einer Merlin-Reexpression auf die Apoptose humaner Schwannomzellen beschreibt. Bekannt war lediglich, dass die Überexpression von Merlin in primären Ratten-Schwannzellen zu einer verstärkten Apoptose führt (Herrlich *et al.*, 2000). Bei den hier untersuchten kultivierten NF2-Tumorzellen NF2.6, NF2.11 und NF2.13 wurden apoptotische Zellen in der Kultur mit Anteilen von 2.6-7.2% ermittelt (uninfizierte Zellen, Tab. 14). Die Varianz bezüglich der basalen Apoptoseraten ist nicht weiter erstaunlich, wenn man die experimentelle Notwendigkeit berücksichtigt, dass Zellen aus drei verschiedenen Patiententumoren mit unterschiedlichen Mutationen im NF2-Gen untersucht wurden. Nach der retroviralen Infektion waren in den Merlin-reexprimierenden NF2-Schwannzellen die Apoptoseraten interessanterweise deutlich verändert. Sowohl die das Wildtyp-Merlinprotein exprimierenden Zellen (LMIEG), als auch die das LEGM-Fusionsprotein exprimierenden NF2-Schwannzellen weisen einheitlich eine in etwa doppelt so hohe Anzahl apoptotischer Zellen auf (6.9-14.7%), wie die entsprechenden uninfizierten, oder die nur EGFP-exprimierenden Kontrollzellen. Die Expression des zweiten Fusionsproteins LMEG dagegen führte in den Zellen des Tumors NF2.13 zwar ebenfalls zu einer wenn auch geringeren Erhöhung der Apoptoserate (Tab. 14). Da die Expression des LMEG-Proteins in den Zellen der NF2.6- und NF2.11-Tumorpräparationen aber zu einem unveränderten bzw. sogar leicht erniedrigten Apoptoseverhalten führte (Tab. 14), kann der Einfluss des LMEG-Fusionsproteins auf den programmierten Zelltod von NF2-Zellen im Rahmen dieser Studie nicht als eindeutig angesehen werden. Möglicherweise wird die bei den LMIEG- und LEGM-Konstrukten beobachtete stimulierende Eigenschaft von Merlin auf die Apoptose von NF2-Zellen durch den C-terminalen EGFP-Anteil im LMEG-Fusionsprotein gestört, weil notwendige Interaktionen mit anderen Proteinen nicht mehr möglich sind. In diesem Zusammenhang ist es interessant daran zu erinnern, dass auch der Merlin-Antikörper C18, der im C-terminalen Teil des Proteins bindet, das Merlinepitop im LMEG-Fusionsprotein nicht detektiert (Abb. 13). Diese Beobachtung unterstützt die gerade formulierte Vermutung, dass durch die Fusion mit EGFP die Konformation des Carboxylterminus des Merlinproteins verändert ist und somit das LMEG-Protein unter Umständen an einer apoptoseinduzierenden Funktion stört. Zwar zeigten die weiter oben geschilderten Experimente zur Proliferationsaktivität von Merlin-reexprimierenden NF2-Schwannzellen im Gegensatz zu den hier gemachten Beobachtungen, dass weder die C- noch die N-terminale Fusion von Merlin mit EGFP einen sichtbaren Einfluss auf die proliferationssenkende Funktion des Merlinproteins in NF2-Zellen hat, allerdings liegt diesem Unterschied sehr wahrscheinlich ein anderer zellulärer Signalweg

zugrunde. Die beobachteten Unterschiede der beiden Merlin-EGFP-Fusionsproteine Apoptose zu induzieren und die Tatsache, dass die retroviral vermittelte rekombinante Expression von EGFP nicht zu einem Anstieg der basalen Apoptoserate führt, lässt vermuten, dass die gesteigerte Apoptoserate in Merlin-reexprimierenden NF2-Schwanzzellen auf einem spezifischen Effekt aufgrund der biologischen Funktion von Merlin beruht. Andernfalls müsste man erwarten, dass durch die Expression aller getesteten Konstrukte Apoptose ausgelöst wird.

Der Mechanismus der Apoptoseinduktion durch virale Proteine spielt in den hier untersuchten Zellen keine Rolle. Von verschiedenen Virusarten ist bekannt, dass bestimmte virale Proteine in Kulturzellen Apoptose induzieren. Das geschieht in der Regel in späten Stadien der Infektion und führt zur Freisetzung der Viren und zur Neuinfektion von Nachbarzellen (Teodoro und Branton, 1997). Da die in dieser Arbeit zur Infektion verwendeten Retroviren jedoch replikationsinkompetent sind und keine viralen Proteine exprimieren und zudem in den mit dem Kontrollvirus LEG infizierten Zellen wie bereits erwähnt keine erhöhte Apoptoserate zu beobachten war, ist ein viral induzierter Apoptosestimulus auszuschließen.

Die Apoptosedaten der LMIEG- und LEGM-infizierten NF2-Zellen untermauern vielmehr die eingangs aufgestellte Hypothese, dass der Tumorsuppressor Merlin in humanen Schwanzzellen einen stimulierenden Effekt auf die Apoptose hat und dass diese Wirkung in NF2-Tumorzellen reduziert oder aufgehoben ist. Da dieser Apoptose stimulierende Effekt des Merlinproteins auch in Ratten-Schwanzzellen sichtbar ist (Herrlich *et al.*, 2000), nicht aber in den in dieser Arbeit untersuchten HeLa-Zellen oder in Meningeom-Zellen (Ikeda *et al.*, 1999), ist der Einfluss von Merlin auf die Apoptose möglicherweise auf Schwanzzellen beschränkt.

4.4 Zellmorphologie und Actinzytoskelett

Die Morphologie von NF2-Schwanzzellen und humanen Kontrollschwanzzellen (Schwanzzellen aus Nervenbiopsien) unterscheidet sich stark. Kontrollschwanzzellen sind überwiegend spindelförmig und bipolar, während NF2-Schwanzzellen zumeist multipolar sind und zum Teil sehr lange Ausläufer haben, die in Lamellipodien- und Filopodien-ähnlichen Ausstülpungen enden (Rosenbaum *et al.*, 1998). NF2-Schwanzzellen sind zudem deutlich größer als Kontrollschwanzzellen (Kamleiter *et al.*, 1998; Pelton *et al.*, 1998) und wachsen aufgrund fehlender Wachstumsinhibition bei Zell-Zell-Kontakten in mehreren Schichten übereinander (Rosenbaum *et al.*, 1998).

Eine veränderte Zellmorphologie wird darüber hinaus auch in verschiedenen Merlin-überexprimierenden Zelllinien beobachtet. Lutchmann und Rouleau (1995) beschreiben, dass NIH3T3-Zellen durch Überexpression von Merlin ihre flache, spindelförmige Gestalt verlieren, sich abrunden und globulär werden und sehr lange Zellausläufer bilden. Diese morphologischen Veränderungen von NIH3T3-Zellen werden durch die Gabe von Merlin-antisense-Oligonukleotiden, was die Merlin Expression senkt, revertiert.

Die Ausbildung sehr langer Zellausläufer und die Abrundung der eher epithelialen Zellen wird nach Mikroinjektion von Merlin-cDNA in den Nukleus auch bei VA 13-Zellen beobachtet (Koga *et al.*, 1998). Ein ähnliches Bild ergaben Untersuchungen der Morphologie von Cos-1-, 293- und CHO-Zellen nach Transfektion mit Merlin-cDNA (Sainio *et al.*, 1997). Bei allen drei Zellarten führte die Expression von Merlin zu einer Verlängerung des gesamten Zellkörpers.

Die beschriebenen morphologischen Veränderungen und der Verlust der Kontaktinhibition bei NF2-Schwanzzellen sind wahrscheinlich auf ein Fehlen von funktionellem Merlinprotein in diesen Zellen zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Reexpression von Merlin in NF2-Schwanzzellen zu einer Reversion der Zellmorphologie in Richtung der normalen Morphologie von Kontrollschwanzzellen führt. NF2-Zellen aus den Tumoren NF2.6, NF2.11 und NF2.13 wurden dazu mit EGFP- und Merlin-EGFP-exprimierenden Retroviren infiziert und 8–14 Tage lang kultiviert. Während dieser Zeit wurde die Morphologie Merlin-reexprimierender Zellen mit der von uninfizierten NF2-Zellen bzw. mit nur EGFP-exprimierenden NF2-Zellen mehrmals verglichen. Dabei konnte weder zu Beginn der Merlin-Reexpression noch nach einem Expressionszeitraum von 14 Tagen eine sichtbare Veränderung in der Morphologie oder dem mehrschichtigen Wachstumsverhalten der Zellen festgestellt werden (Abb. 25). Merlin-reexprimierende Zellen haben nach wie vor zum Teil sehr große Zellkörper mit vielen Ausläufern und zeigen keine Wiederherstellung der Kontaktinhibition. Diese Beobachtung wurde auch von Ikeda und Mitarbeitern (1999) gemacht, die die Morphologie von humanen Meningeoma-Zellen nach Expression von Merlin über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht haben. Weder bei Meningeoma-Zellen von NF2-Patienten, die nachweislich kein endogenes Merlinprotein exprimierten noch bei Meningeoma-Zellen von Nicht-NF2-Patienten konnte eine Veränderung der Zellmorphologie durch die Expression von Merlin detektiert werden, obwohl Meningeoma-Zellen auch zu den „Zielzellen“ gehören, in denen Merlin eine Tumorsuppressor-Funktion ausübt (Rutledge *et al.*, 1994; Wellenreuther *et al.*, 1995). Wahrscheinlich sind die Ergebnisse mit NF2-Schwanzzellen und humanen Meningeoma-Zellen (i) auf die per se sehr uneinheitliche Morphologie dieser Zellen und (ii) auf eine für die Detektion von morphologischen Veränderungen möglicherweise nicht ausreichende Infektionseffizienz zurückzuführen. Die bereits erwähnte Untersuchung von Sainio *et al.* (1997), verwendete beispielsweise für die quantitative Analyse von Zelldurchmesser und

Zelllänge nach Merlin-Überexpression nur die CHO-Zellen, weil diese im Vergleich zu Cos-1- und 293-Zellen die geringste Variabilität in der Zellform aufweisen. Ein anderes Beispiel sind die in dieser Arbeit untersuchten Merlin-überexprimierenden HeLa-Zellen. Veränderungen in der Morphologie waren in den anfangs untersuchten HeLa-Zellkulturen trotz Infektionsraten von 61–77% nicht sichtbar und konnten erst detektiert werden, als nach Einzelzellklonierung Zellpopulationen vorlagen, in denen jede Zelle Merlin überexprimierte. Für die Untersuchung Merlin-reexprimierender NF2-Zellen würde das bedeuten, dass die Infektionseffizienz noch deutlich erhöht werden müsste, um mögliche Änderungen in der Zellform erkennen zu können. Eine Einzelzellklonierungs- oder FACS-Sortierungs-Strategie ist bei den verwendeten humanen NF2-Zellen nicht anwendbar, weil die Zellen nicht stark proliferieren und nur über wenige Passagen kultivierbar sind. Damit ist eine ausreichende Expansion der klonierten oder sortierten Zellen nicht möglich.

Wie bereits erwähnt, wurde auch die Morphologie der einzelzellklonierten HeLa-Zellkulturen untersucht. In diesen Zellpopulationen war ein deutlicher morphologischer Unterschied zwischen den Merlin-überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen sichtbar. Uninfizierte und EGFP-exprimierende Kontrollzellkulturen weisen neben eher rundlichen Zellen auch etwa ebenso viele langgestreckte Zellen auf. Nach Merlin-Überexpression ist die Anzahl an Zellen mit länglicher Form stark reduziert und eine abgerundete Zellform vorherrschend (Abb.16). Die beobachteten morphologischen Veränderungen werden durch die Expression aller drei Merlin-EGFP-Konstrukte induziert.

Neben dieser Veränderung, die die gesamte Zellform betrifft, weisen die Merlin-überexprimierenden HeLa-Zellen zudem einen stark gewellten Plasmasaum auf. Dabei handelt es sich um eine gegenüber uninfizierten oder EGFP-exprimierenden Kontrollzellen deutlich gesteigerte Bildung von Lamellipodien („ruffling membranes“).

Die Lokalisierung von endogenem und exogenem Merlinprotein in dynamischen Zellregionen wie Lamellipodien und Filopodien, sowie anderen actinreichen Zellstrukturen wie Mikrovilli und Fokalkontakten ist bekannt (Xu *et al.*, 1998; Gonzalez-Agosti *et al.*, 1996; Schmucker *et al.*, 1996). Auch eine transiente Umstrukturierung des Actinzytoskeletts in Merlin-überexprimierenden transformierten Ratten-Schwanzzellen sowie die Inhibition Zytoskelett-vermittelter Prozesse wie Zellmobilität, Ausspreiten und Anheften der Zellen ist beschrieben (Gutmann *et al.*, 1999). Die verstärkte Bildung von Lamellipodien in Merlin-überexprimierenden HeLa-Zellen ist daher möglicherweise auf eine Ansammlung von Merlinprotein in diesem Bereich und eine durch die Merlin Expression induzierte Umorganisation des Actinzytoskeletts zurückzuführen. Die Konzentration des Merlinproteins auf Bereiche der Plasmamembran ist sehr deutlich in den HeLa-Zellen sichtbar, die Merlin-EGFP-Fusionsproteine exprimieren und in denen es zu einer Merlin-vermittelten Lokalisierung von EGFP in der Zellperipherie kommt (Abb. 24).

In zukünftigen Experimenten muss nun untersucht werden, ob mit diesen morphologischen Veränderungen, die in Merlin-überexprimierenden HeLa-Zellen auftreten, auch Änderungen in den oben erwähnten funktionellen Prozessen einhergehen.

Morphologische Unterschiede, wie sie für NIH3T3-Fibroblasten von Lutchmann und Rouleau (1995) beschrieben wurden, konnten bei den hier untersuchten NIH3T3-Zellkulturen nicht beobachtet werden. Lutchmann und Rouleau fanden in den von ihnen untersuchten NIH3T3-Zellen sehr deutliche Unterschiede in der Zellform von transfizierten und untransfizierten Zellen. Diese Merlin-überexprimierenden NIH3T3-Zellen hatten neben einer abgerundeten und globulären Form auch Zellausläufer, deren Länge dem 5–10fachen des Zelldurchmessers entsprach. Da solche prägnanten Veränderungen kaum zu übersehen sind, können die fehlenden Änderungen in der Zellform der in dieser Arbeit untersuchten NIH3T3-Zellen nur auf die Verwendung eines anderen Subtyps von NIH3T3-Zellen oder auf veränderte Zellkulturbedingungen zurückzuführen sein.

Offensichtlich führt die Überexpression von Merlin je nach untersuchter Zelllinie zu einer Abrundung der Zellen (HeLa-Zellen; VA 13-Zellen, Koga *et al.*, 1998; NIH3T3-Zellen, Lutchmann und Rouleau, 1995) oder zu einer Verlängerung bzw. Streckung des Zellkörpers (CHO-, Cos-1- und 293-Zellen, Sainio *et al.*, 1997).

4.5 Merlin/EGFP–Lokalisierung

Das NF2-Protein Merlin weist eine hohe Sequenzidentität zu den ERM-Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin auf, Mitgliedern der Band 4.1-Proteinfamilie, die als Linker-Moleküle zwischen dem Actinzytoskelett und dynamischen Regionen der Plasmamembran wirken (zusammengefasst in Mangeat *et al.*, 1999). Wie die ERM-Proteine ist endogenes und auch rekombinantes Merlinprotein unterhalb der Plasmamembran und in actinreichen Strukturen wie Lamellipodien, Filopodien und Fokalkontakten verschiedenster Kulturzellen nachgewiesen worden. Diese Lokalisierung wurde beschrieben in Cos-1- und Cos-7-Zellen (den Bakker *et al.*, 1995b; Sainio *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1998), 293-Zellen (Sainio *et al.*, 1997; Stokowski und Cox, 2000), CHO-Zellen (Sainio *et al.*, 1997), HeLa-Zellen (Deguen *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1998b; Maeda *et al.*, 1999), NIH3T3-Zellen (Shaw *et al.*, 1998b; Maeda *et al.*, 1999), humanen Fibroblasten (Schmucker *et al.*, 1997), primären Ratten-Schwanzzellen (Xu *et al.*, 1998) und ST88-14 Ratten-Schwannomzellen (Scherer und Gutmann, 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine submembranöse Verteilung von rekombinantem Merlinprotein in allen infizierten Kulturzellen (HeLa-Zellen Abb. 15; Daten zu NIH3T3-, 293-Zellen und primären Ratten-Schwanzzellen nicht gezeigt) und damit erstmals auch in kultivierten humanen NF2-Schwannomzellen (Abb. 24) beobachtet werden. Für die Untersuchungen zur Lokalisierung von Merlin wurden die Merlin-EGFP-Fusionsproteine verwendet. Die Fusion von Merlin mit EGFP führte zu einer durch die Merlinsequenz vermittelten intrazellulären Verteilung der Fusionsproteine, die durch die EGFP-Autofluoreszenz detektierbar war. Während in Zellen, die mit dem LEG- oder dem LMIEG-Virus infiziert wurden, eine homogene Verteilung des separat exprimierten EGFP-Proteins im Zytoplasma und im Kern sichtbar war, führte die Expression beider Merlin-EGFP-Fusionsproteine (LMEG, LEGM) zu einer verstärkten Ansammlung von EGFP im Bereich der Plasmamembran (Abb. 15 und 24). Damit zeigen die in dieser Arbeit ermittelten Daten, dass rekombinantes Merlinprotein nicht nur in verschiedenen Kulturzellen, sondern auch in humanen NF2-Schwannomzellen in kortikalen Regionen der Plasmamembran lokalisiert ist.

Immunzytochemische Analysen von NF2-Zellen aus verschiedenen NF2-Tumoren (NF2.6-, NF2.11-, NF2.13-Schwannomzellen) mit Merlin-spezifischen Antikörpern (A19 und C18), die zusätzlich die zelluläre Verteilung von mutiertem endogenem Merlinprotein aufklären sollten, ergaben keine eindeutigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich führen die verschiedenen Mutationen im Merlingen neben einer verringerten Halbwertszeit (Gutmann et al., 1998) auch zu einer unspezifischen Verteilung der funktionslosen Proteine in humanen NF2-Schwannomzellen.

Die hier beobachtete submembranöse Lokalisierung des rekombinanten Merlinproteins in NF2-Schwannomzellen unterstützt aber die Hypothese, dass Merlin durch eine Interaktion mit dem Actinzytoskelett als Tumorsuppressor wirkt (Rouleau *et al.*, 1993; Trofatter *et al.*, 1993; Lutchman und Rouleau, 1996).

4.6 CD44-Expression

CD44 ist ein in vielen Zelltypen exprimiertes Glykoprotein der Zelloberfläche, das bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen eine wichtige Rolle spielt (Lesley *et al.*, 1993). CD44 liegt in einer Vielzahl von Isoformen vor, die sich in ihrer Glykosylierung und durch die Insertion sogenannter variabler Exons unterscheiden (Screaton *et al.*, 1992). Die CD44-Standardisoform (CD44s, 85 kDa) ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure, einem Glycosaminoglykan der extrazellulären Matrix (Aruffo *et al.*, 1990). Eine erhöhte Expression des CD44-Rezeptors sowie die Expression von variablen Isoformen (CD44v1-v10) wird mit

der Entwicklung verschiedener Tumore und Metastasen in Verbindung gebracht (Gunthert *et al.*, 1991; Wielenga *et al.*, 1993). Sherman und Mitarbeiter (1997b) haben in Western Blot-Analysen gezeigt, dass NF2-Tumore verglichen mit normalem Nervengewebe die 3-4-fache Menge Gesamt-CD44 exprimieren. Zusätzlich konnten sie durch Immunfärbungen mit Antikörpern gegen verschiedene CD44-Spleißvarianten eine spezifische Expression der Spleißvariante CD44v10 in NF2-Tumorgewebe nachweisen, die in normalen Nervengeweben nicht auftritt.

Um die CD44v10-Expression von Kulturzellen aus NF2-Tumoren und Multiorganspender-Nerven zu überprüfen, wurden Zellen der Tumore NF2.6, NF2.11 und NF2.13 sowie der Kontrollnerven MOS48, MOS51 und MOS53 mit einem CD44v10-Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Dabei konnte kein Unterschied in der Expressionsstärke detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Diskrepanz zu den Daten von Sherman *et al.* (1997b) ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass in der vorliegenden Untersuchung nicht komplexes Tumorgewebe sondern daraus gewonnene Kulturzellen untersucht wurden, bei denen sich möglicherweise aufgrund der veränderten *in vitro* Organisation der NF2-Zelllayer auch die Expression mancher Oberflächenmarker verändert hat.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde kontrolliert, ob durch die Reexpression von Merlin in den NF2-Schwannomzellen die *in vivo* beschriebene verstärkte Expression von Gesamt-CD44 (Sherman *et al.*, 1997b) beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurden Western-Blot-Analysen mit Gesamt-Membranprotein aus infizierten und uninfizierten NF2.13-Tumorzellen durchgeführt (Abb. 27). Die Immunfärbungen mit dem Hermes-3 Antikörper, der den konstanten Teil des CD44-Proteins und damit sämtliche CD44-Varianten detektiert, zeigte in allen untersuchten Zellpopulationen identische Banden zwischen 50 kDa und 100 kDa, die unterschiedlich stark glykosylierte CD44-Proteinisofomere darstellen. Eine Verminderung der *in vitro* CD44-Expression in NF2-Schwannomzellen durch die Reexpression von Merlin konnte nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis kann darauf zurückzuführen sein, dass eine einmal (durch fehlende oder aberrante Merlinexpression) induzierte hohe Expression von CD44-Rezeptormolekülen auch durch eine spätere Reexpression von Merlin nicht mehr revertiert werden kann. In weiterführenden, zukünftigen Experimenten muss aber zunächst überprüft werden, ob in kultivierten Schwannzellen aus humanen gesunden Multiorganspendern sowie aus NF2-Tumoren überhaupt ein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke an Gesamt-CD44-Protein zwischen kultivierten NF2- und MOS-Zellen besteht, wie es von Sherman und Mitarbeitern (1997b) für die *in vivo*-Situation beschrieben wurde.

4.7 Ausblick

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Dissertation ergeben sich verschiedene Aspekte, die für weitere Forschungsprojekte zur Analyse der molekularen Grundlagen der Erkrankung Neurofibromatose 2 von Interesse sind.

Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reexpression des Merlinproteins in NF2-Tumorzellen unter subkonfluenten Kulturbedingungen zu einer Verminderung der Proliferationsrate aufgrund einer Arretierung der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklusses führt. Bisherige Untersuchungen an etablierten Zelllinien, hatten dagegen nur unter konfluenten Kulturbedingungen einen Effekt der Merlin-Überexpression feststellen können. Das bedeutet möglicherweise, dass Merlin unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle ausüben kann. In sogenannten Zielzellen, wie NF2-Tumorzellen, die kein funktionelles Merlinprotein exprimieren, hat die Reexpression des Proteins über einen noch unbekanntem Mechanismus einen direkten Einfluss auf die Zellwachstumskontrolle und führt zu einem Zellzyklusarrest. Dagegen kommt es in verschiedenen Zelllinien durch die Überexpression von Merlin zur Wiederherstellung der Kontaktinhibition, wodurch unter konfluenten Kulturbedingungen ebenfalls ein Wachstumsstopp der Zellen zu beobachten ist. Diese unterschiedliche Wirkungsweise von Merlin lässt es sinnvoll und notwendig erscheinen, zukünftige vergleichende Untersuchungen sowohl an Merlin-reexprimierenden NF2-Tumorzellen als auch an Zelllinien durchzuführen. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Isolierung von Interaktionspartnern von Merlin und die Aufklärung der/zellulären Signalwege(s), an dem das Merlinprotein beteiligt ist, wichtig. Nur so kann definitiv geklärt werden, ob es sich bei den beobachteten Unterschieden in der Wirkung einer Merlin Re- bzw. Überexpression um zellspezifische Unterschiede oder um verschiedene Funktionen des Merlinproteins handelt.

Um weitere Analysen zu den Auswirkungen der Merlin-Reexpression in humanen NF2-Tumorzellen durchführen zu können ist es darüber hinaus wünschenswert, die Transduktionseffizienz zu steigern. So sollten beispielsweise auch geringe morphologische Veränderungen, oder Veränderungen im Actinzytoskelett der Zellen besser detektiert werden können. Ein Ansatzpunkt zur Verbesserung der Transduktionsrate bei retroviralem Gentransfer liegt z. B. in der Wahl des verwendeten Envelope-Proteins. Vorversuche mit rekombinanten Retroviren, die mit dem Envelope-Protein des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) pseudotypisiert wurden, führten bei einmaliger Infektion über 4-8h zu einer Infektionseffizienz humaner Schwanzzellen von durchschnittlich 65% und lassen somit eine Transduktionsrate nahe 100% durch mehrmalige Infektion möglich erscheinen.

5 Zusammenfassung

Die Erkrankung Neurofibromatose 2 ist durch die Ausbildung verschiedener Tumore des Nervensystems, insbesondere durch Schwannzelltumore (Schwannome) charakterisiert, die durch Mutationen im NF2-Krankheitsgen entstehen. Das NF2-Gen kodiert ein Protein namens Merlin, das eine große Sequenzidentität zu den ERM-Proteinen aufweist, die als Linker-Moleküle zwischen Plasmamembran und Actinzytoskelett wirken. Merlin ist wie die ERM-Proteine in actinreichen Regionen der Plasmamembran von Kulturzellen und Geweben lokalisiert, ohne dass seine Rolle als molekularer Linker bislang nachgewiesen werden konnte. Obwohl die genaue Funktion von Merlin in der Zelle und der Pathomechanismus der Tumorentstehung nicht bekannt sind, hält man das Merlinprotein aufgrund verschiedener Untersuchungen, bei denen seine Überexpression zu einer Reduktion des Zellwachstums oder zur Wiederherstellung der Kontaktinhibition in unterschiedlichen Zelllinien führte, für einen Tumorsuppressor.

Bisher sind fast alle Daten zur Wirkungsweise von Merlin mit Hilfe etablierter Zelllinien erhoben worden. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals der Versuch unternommen, die Effekte einer stabilen Reexpression des Merlinproteins in humanen NF2-Schwannomzellen zu untersuchen, die aus Tumoren von Neurofibromatose 2-Patienten gewonnen wurden. Die effiziente Transduktion der humanen Schwannomzellen sowie die andauernde Expression von rekombinantem Merlinprotein in den NF2-Zellen wurde durch den Einsatz von Retroviren als Gentransfer-Vehikel erreicht.

Die Reexpression von Merlin in humanen NF2-Schwannomzellen, die kein funktionelles endogenes Merlinprotein exprimieren, führte zu einer deutlichen Reduktion der Proliferationsrate, die durch einen Arrest der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklusses verursacht wurde. Diese Reduktion konnte in allen untersuchten Patiententumoren, die unterschiedliche NF2-Mutationen in der Keimbahn und im Soma aufwiesen, beobachtet werden. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Einfluss von Merlin auf die Proliferationsaktivität subkonfluenter Merlin reexprimierender NF2-Schwannomzellen weist auf einen besonderen Wirkmechanismus hin, da die meisten bisherigen Untersuchungen einen inhibierenden Effekt von Merlin auf das Zellwachstum durch die Wiederherstellung der Kontaktinhibition bei konfluenten Zellkulturen beschreiben. Es ist daher zu vermuten, dass das Merlinprotein über unterschiedliche zelluläre Signalwege in die Zellwachstumskontrolle eingreifen kann. Diese Vermutung wird auch durch die vorliegenden Experimente mit HeLa-Zellen gestützt, die eine Steigerung der Zellproliferation in Merlin überexprimierenden Kulturen bei konfluenter Zelldichte oder nach 24stündigem Serumentzug, nicht aber unter

subkonfluenten Bedingungen belegen. Das bedeutet, dass Merlin prinzipiell eine Wirkung auf das Proliferationsverhalten von Zellen *in vitro* ausübt, dass aber der beobachtete Effekt vom untersuchten Zelltyp, den gewählten Kulturbedingungen und der Menge an exprimiertem Merlinprotein abhängt.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in Merlin reexprimierenden NF2-Zellpopulationen verstärkt Apoptose induziert wird. Der Tumorsuppressor Merlin hat also offensichtlich einen bisher unbekanntem stimulierenden Effekt auf die Apoptoserate von humanen Schwannzellen, der in NF2-Tumorzellen reduziert oder aufgehoben ist. Ein fehlender Effekt der Merlin-Reexpression auf die Apoptoserate der hier untersuchten HeLa-Zellen sowie die Ergebnisse anderer Untersuchungen an Meningeoma-Zellen und Ratten Schwannomzellen legen die Vermutung nahe, dass der Einfluss von Merlin auf die Apoptose möglicherweise auf Schwannzellen beschränkt ist.

Veränderungen in der Zellmorphologie, wie sie für verschiedene Merlin überexprimierende etablierte Zelllinien beschrieben waren, waren auch in den untersuchten HeLa-Zellen, nicht aber in den humanen NF2-Schwannomzellen sichtbar. Der beobachtete Einfluss der Merlin-Expression auf die Zellmorphologie ist vermutlich auf die Sequenzidentität von Merlin zu den ERM-Proteinen und die Lokalisierung im Bereich kortikaler Actinstrukturen – die in allen hier untersuchten Zellen nachgewiesen wurde – zurückzuführen.

Ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke des CD44-Rezeptors oder der Expression der variablen Isoform CD44v10 auf der Oberfläche von NF2-Tumorzellen und der Reexpression von Merlin konnte nicht festgestellt werden.

6 LITERATUR

- Almeida, E. A., Ilic, D., Han, Q., Hauck, C. R., Jin, F., Kawakatsu, H., Schlaepfer, D. D., and Damsky, C. H.** (2000). Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol.* **149**, 741-754.
- Andreadis, S. T., Brott, D., Fuller, A. O., and Palsson, B. O.** (1997). Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. *J. Virol.* **71**, 7541-7548.
- Arakawa, H., Hayashi, N., Nagase, H., Ogawa, M., and Nakamura, Y.** (1994). Alternative splicing c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol.* **149**, 741-754. of the NF2 gene and its mutation analysis of breast and colorectal cancers. *Hum.Mol.Genet.* **3**, 565-568.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. , and Seed, B.** (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**, 1303-1313.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S., and Santa, C. S.** (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* **7**, 1045-1053.
- Bianchi, A. B., Hara, T., Ramesh, V., Gao, J., Klein-Szanto, A. J., Morin, F., Menon, A. G., Trofatter, J. A. , Gusella, J. F., and Seizinger, B. R.** (1994). Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumour types. *Nat.Genet.* **6**, 185-192.
- Bianchi, A. B., Mitsunaga, S. I., Cheng, J. Q., Klein, W. M., Jhanwar, S. C., Seizinger, B., Kley, N., Klein-Szanto, A. J., and Testa, J. R.** (1995). High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 10854-10858.
- Bijlsma, E. K., Merel, P., Bosch, D. A., Westerveld, A., Delattre, O., Thomas, G., and Hulsebos, T. J.** (1994). Analysis of mutations in the SCH gene in schwannomas. *Genes Chromosomes.Cancer* **11**, 7-14.
- Bretscher, A., Reczek, D., and Berryman, M.** (1997). Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J.Cell Sci.* **110 (Pt 24)**, 3011-3018.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J. K.** (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 8033-8037.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Chalfie, M.** (1995). Green fluorescent protein. *Photochem.Photobiol.* **62**, 651-656.
- Chen, L. M., Bailey, D., and Fernandez-Valle, C.** (2000). Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J.Neurosci.* **20**, 3776-3784.

- Cheng, L., Fu, J., Tsukamoto, A., and Hawley, R. G.** (1996). Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* **14**, 606-609.
- Chishti, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S. C., Low, P. S., Rouleau, G. A., Mohandas, N., Chasis, J. A., Conboy, J. G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S. C., Benz, E. J., Jr., Bretscher, A., Fehon, R. G., Gusella, J. F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V. T., Tsukita, S., Tsukita, S., and Hoover, K. B.** (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 281-282.
- Chowdhury, K.** (1991). One step 'miniprep' method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2792.
- Deguen, B., Merel, P., Goutebroze, L., Giovannini, M., Reggio, H., Arpin, M., and Thomas, G.** (1998). Impaired interaction of naturally occurring mutant NF2 protein with actin-based cytoskeleton and membrane. *Hum.Mol.Genet.* **7**, 217-226.
- den Bakker, M. A., Tascilar, M., Riegman, P. H., Hekman, A. C., Boersma, W., Janssen, P. J., de Jong, T. A., Hendriks, W., van der Kwast, T. H., and Zwarthoff, E. C.** (1995a). Neurofibromatosis type 2 protein co-localizes with elements of the cytoskeleton. *Am.J.Pathol.* **147**, 1339-1349.
- den Bakker, M. A., Riegman, P. H., Hekman, R. A., Boersma, W., Janssen, P. J., van der Kwast, T. H., and Zwarthoff, E. C.** (1995b). The product of the NF2 tumour suppressor gene localizes near the plasma membrane and is highly expressed in muscle cells. *Oncogene* **10**, 757-763.
- den Bakker, M. A., Vissers, K. J., Molijn, A. C., Kros, J. M., Zwarthoff, E. C., and van der Kwast, T. H.** (1999). Expression of the neurofibromatosis type 2 gene in human tissues. *J.Histochem.Cytochem.* **47**, 1471-1480.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P.** (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol.Cell Biol.* **7**, 379-387.
- Evans, D. G., Huson, S. M., Donnai, D., Neary, W., Blair, V., Teare, D., Newton, V., Strachan, T., Ramsden, R., and Harris, R.** (1992). A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J.Med.Genet.* **29**, 841-846.
- Flach, J., Bossie, M., Vogel, J., Corbett, A., Jinks, T., Willins, D. A., and Silver, P. A.** (1994). A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol.Cell Biol.* **14**, 8399-8407.
- Gautreau, A., Pouillet, P., Louvard, D., and Arpin, M.** (1999). Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 7300-7305.
- Gluck, U., Kwiatkowski, D. J., and Ben Ze'ev, A.** (1993). Suppression of tumorigenicity in simian virus 40-transformed 3T3 cells transfected with alpha-actinin cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 383-387.
- Gonzalez-Agosti, C., Xu, L., Pinney, D., Beauchamp, R., Hobbs, W., Gusella, J., and Ramesh, V.** (1996). The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene* **13**, 1239-1247.

- Gonzalez-Agosti, C., Wiederhold, T., Herndon, M. E., Gusella, J., and Ramesh, V.** (1999). Interdomain interaction of merlin isoforms and its influence on intermolecular binding to NHERF. *J.Biol.Chem.* **274**, 34438-34442.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfranccone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., and Pelicci, P. G.** (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* **58**, 14-19.
- Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P.** (1991). A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**, 13-24.
- Gusella, J. F., Ramesh, V., MacCollin, M., and Jacoby, L. B.** (1999). Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim.Biophys.Acta* **1423**, M29-M36.
- Gutmann, D. H., Giordano, M. J., Fishback, A. S., and Guha, A.** (1997a). Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology* **49**, 267-270.
- Gutmann, D. H.** (1997b). Molecular insights into neurofibromatosis 2. *Neurobiol.Dis.* **3**, 247-261.
- Gutmann, D. H., Aylsworth, A., Carey, J. C., Korf, B., Marks, J., Pyeritz, R. E., Rubenstein, A., and Viskochil, D.** (1997c). The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* **278**, 51-57.
- Gutmann, D. H., Geist, R. T., Xu, H., Kim, J. S., and Saporito-Irwin, S.** (1998). Defects in neurofibromatosis 2 protein function can arise at multiple levels. *Hum.Mol.Genet.* **7**, 335-345.
- Gutmann, D. H., Haipek, C. A., and Hoang, L. K.** (1999a). Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein, merlin, forms two functionally important intramolecular associations. *J.Neurosci.Res.* **58**, 706-716.
- Gutmann, D. H., Sherman, L., Seftor, L., Haipek, C., Hoang, L. K., and Hendrix, M.** (1999b). Increased expression of the NF2 tumor suppressor gene product, merlin, impairs cell motility, adhesion and spreading. *Hum.Mol.Genet.* **8**, 267-275.
- Gutmann, D. H., Haipek, C. A., Burke, S. P., Sun, C. X., Scoles, D. R., and Pulst, S. M.** (2001). The NF2 interactor, hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS), associates with merlin in the 'open' conformation and suppresses cell growth and motility. *Hum.Mol.Genet.* **10**, 825-834.
- Gutmann, D. H.** (2001). The neurofibromatoses: when less is more. *Hum.Mol.Genet.* **10**, 747-755.
- Haase, V. H., Trofatter, J. A., MacCollin, M., Tarttelin, E., Gusella, J. F., and Ramesh, V.** (1994). The murine NF2 homologue encodes a highly conserved merlin protein with alternative forms. *Hum.Mol.Genet.* **3**, 407-411.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hara, T., Bianchi, A. B., Seizinger, B. R., and Kley, N.** (1994). Molecular cloning and characterization of alternatively spliced transcripts of the mouse neurofibromatosis 2 gene. *Cancer Res.* **54**, 330-335.

- Harada, T., Irving, R. M., Xuereb, J. H., Barton, D. E., Hardy, D. G., Moffat, D. A., and Maher, E. R. (1996). Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J.Neurosurg.* **84**, 847-851.
- Hawley, R. G., Lieu, F. H., Fong, A. Z., and Hawley, T. S. (1994). Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy. *Gene Ther.* **1**, 136-138.
- Henry, M. D., Gonzalez, A. C., and Solomon, F. (1995). Molecular dissection of radixin: distinct and interdependent functions of the a. *J.Cell Biol.* **129**, 1007-1022.
- Herrlich, P., Morrison, H., Sleeman, J., Orian-Rousseau, V., Konig, H., Weg-Remers, S., and Ponta, H. (2000). CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **910**, 106-118.
- Hopert, A., Uphoff, C. C., Wirth, M., Hauser, H., and Drexler, H. G. (1993). Mycoplasma detection by PCR analysis. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* **29A**, 819-821.
- Huang, L., Ichimaru, E., Pestonjamas, K., Cui, X., Nakamura, H., Lo, G. Y., Lin, F. I., Luna, E. J., and Furthmayr, H. (1998). Merlin differs from moesin in binding to F-actin and in its intra- and intermolecular interactions. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **248**, 548-553.
- Huynh, D. P., Nechiporuk, T., and Pulst, S. M. (1994). Alternative transcripts in the mouse neurofibromatosis type 2 (NF2) gene are conserved and code for schwannomins with distinct C-terminal domains. *Hum.Mol.Genet.* **3**, 1075-1079.
- Huynh, D. P. and Pulst, S. M. (1996). Neurofibromatosis 2 antisense oligodeoxynucleotides induce reversible inhibition of schwannomin synthesis and cell adhesion in STS26T and T98G cells. *Oncogene* **13**, 73-84.
- Ikeda, K., Saeki, Y., Gonzalez-Agosti, C., Ramesh, V., and Chiocca, E. A. (1999). Inhibition of NF2-negative and NF2-positive primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. *J.Neurosurg.* **91**, 85-92.
- Ilic, D., Almeida, E. A., Schlaepfer, D. D., Dazin, P., Aizawa, S., and Damsky, C. H. (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J.Cell Biol.* **143**, 547-560.
- Jacoby, L. B., MacCollin, M., Louis, D. N., Mohny, T., Rubio, M. P., Pulaski, K., Trofatter, J. A., Kley, N., Seizinger, B., and Ramesh, V. (1994). Exon scanning for mutation of the NF2 gene in schwannomas. *Hum.Mol.Genet.* **3**, 413-419.
- Kaiser-Kupfer, M. I., Freidlin, V., Datiles, M. B., Edwards, P. A., Sherman, J. L., Parry, D., McCain, L. M., and Eldridge, R. (1989). The association of posterior capsular lens opacities with bilateral acoustic neuromas in patients with neurofibromatosis type 2. *Arch.Ophthalmol.* **107**, 541-544.
- Kamleiter, M., Hanemann, C. O., Kluwe, L., Rosenbaum, C., Wosch, S., Mautner, V. F., Muller, H. W., and Grafe, P. (1998). Voltage-dependent membrane currents of cultured human neurofibromatosis type 2 Schwann cells. *Glia* **24**, 313-322.
- Kavanaugh, M. P., Miller, D. G., Zhang, W., Law, W., Kozak, S. L., Kabat, D., and Miller, A. D. (1994). Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 7071-7075.
- Kluwe, L., Bayer, S., Baser, M. E., Hazim, W., Haase, W., Funsterer, C., and Mautner, V. F. (1996). Identification of NF2 germ-line mutations and comparison with neurofibromatosis 2

- phenotypes [published erratum appears in *Hum Genet* 1997 Feb;99(2):292]. *Hum.Genet.* **98**, 534-538.
- Knudson, A. G., Jr.** (1991). Overview: genes that predispose to cancer. *Mutat.Res.* **247**, 185-190.
- Knudson, A. G.** (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 10914-10921.
- Koga, H., Araki, N., Takeshima, H., Nishi, T., Hirota, T., Kimura, Y., Nakao, M., and Saya, H.** (1998). Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM- homology domain. *Oncogene* **17**, 801-810.
- Kotani, H., Newton, P. B., III, Zhang, S., Chiang, Y. L., Otto, E., Weaver, L., Blaese, R. M., Anderson, W. F., and McGarrity, G. J.** (1994). Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum.Gene Ther.* **5**, 19-28.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamszus, K., Vahldiek, F., Mautner, V. F., Schichor, C., Tonn, J., Stavrou, D., Fillbrandt, R., Westphal, M., and Kluwe, L.** (2000). Allelic losses in neurofibromatosis 2-associated meningiomas. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **59**, 504-512.
- Lesley, J., Hyman, R., and Kincade, P. W.** (1993). CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv.Immunol.* **54**, 271-335.
- Levi, A. D., Bunge, R. P., Lofgren, J. A., Meima, L., Hefti, F., Nikolics, K., and Sliwkowski, M. X.** (1995). The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation. *J.Neurosci.* **15**, 1329-1340.
- Louis, D. N., Ramesh, V., and Gusella, J. F.** (1995). Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatosis 2 and related tumors. *Brain Pathol.* **5**, 163-172.
- Lundberg, A. S. and Weinberg, R. A.** (1999). Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur.J.Cancer* **35**, 1886-1894.
- Lutchman, M. and Rouleau, G. A.** (1995). The neurofibromatosis type 2 gene product, schwannomin, suppresses growth of NIH 3T3 cells. *Cancer Res.* **55**, 2270-2274.
- Lutchman, M. and Rouleau, G. A.** (1996). Neurofibromatosis type 2: a new mechanism of tumor suppression. *Trends Neurosci.* **19**, 373-377.
- MacCollin, M., Ramesh, V., Jacoby, L. B., Louis, D. N., Rubio, M. P., Pulaski, K., Trofatter, J. A., Short, M. P., Bove, C., and Eldridge, R.** (1994). Mutational analysis of patients with neurofibromatosis 2. *Am.J.Hum.Genet.* **55**, 314-320.
- MacCollin, M.** (1995). CNS Young Investigator Award Lecture: molecular analysis of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Brain Dev.* **17**, 231-238.
- Maeda, M., Matsui, T., Imamura, M., Tsukita, S., and Tsukita, S.** (1999). Expression level, subcellular distribution and rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with Ezrin/Radixin/Moesin proteins. *Oncogene* **18**, 4788-4797.
- Mangeat, P., Roy, C., and Martin, M.** (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* **9**, 187-192.

- Marshall, J., Molloy, R., Moss, G. W., Howe, J. R., and Hughes, T. E.** (1995). The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* **14**, 211-215.
- Martuza, R. L. and Eldridge, R.** (1988). Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *N.Engl.J.Med.* **318**, 684-688.
- McClatchey, A. I., Saotome, I., Ramesh, V., Gusella, J. F., and Jacks, T.** (1997). The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes Dev.* **11**, 1253-1265.
- Meng, J. J., Lowrie, D. J., Sun, H., Dorsey, E., Pelton, P. D., Bashour, A. M., Groden, J., Ratner, N., and Ip, W.** (2000). Interaction between two isoforms of the NF2 tumor suppressor protein, merlin, and between merlin and ezrin, suggests modulation of ERM proteins by merlin. *J Neurosci.Res.* **62**, 491-502.
- Merel, P., Haong-Xuan, K., Sanson, M., Moreau-Aubry, A., Bijlsma, E. K., Lazaro, C., Moisan, J. P., Resche, F., Nishisho, I., and Estivill, X.** (1995). Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. *Genes Chromosomes.Cancer* **13**, 211-216.
- Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., and Eiden, M. V.** (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J.Virol.* **65**, 2220-2224.
- Miller, A. D.** (1992). Human gene therapy comes of age. *Nature* **357**, 455-460.
- Miller, D. G., Adam, M. A., and Miller, A. D.** (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol.Cell Biol.* **10**, 4239-4242.
- Miller, D. G., Edwards, R. H., and Miller, A. D.** (1994). Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 78-82.
- Miller, A. D.** (1996). Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 11407-11413.
- Morrison, H., Sherman, L. S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C. A., Gutmann, D. H., Ponta, H., and Herrlich, P.** (2001). The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev.* **15**, 968-980.
- Mullauer, L., Fujita, H., Ishizaki, A., and Kuzumaki, N.** (1993). Tumor-suppressive function of mutated gelsolin in ras-transformed cells. *Oncogene* **8**, 2531-2536.
- Mulligan, R. C.** (1993). The basic science of gene therapy. *Science* **260**, 926-932.
- Murthy, A., Gonzalez-Agosti, C., Cordero, E., Pinney, D., Candia, C., Solomon, F., Gusella, J., and Ramesh, V.** (1998). NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H+ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. *J.Biol.Chem.* **273**, 1273-1276.
- Obremski, V. J., Hall, A. M., and Fernandez-Valle, C.** (1998). Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J.Neurobiol.* **37**, 487-501.
- Orford, K., Orford, C. C., and Byers, S. W.** (1999). Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *J.Cell Biol.* **146**, 855-868.

- Palsson, B. and Andreadis, S.** (1997). The physico-chemical factors that govern retrovirus-mediated gene transfer. *Exp.Hematol.* **25**, 94-102.
- Parry, D. M., MacCollin, M. M. , Kaiser-Kupfer, M. I., Pulaski, K., Nicholson, H. S., Bolesta, M., Eldridge, R., and Gusella, J. F.** (1996). Germ-line mutations in the neurofibromatosis 2 gene: correlations with disease severity and retinal abnormalities. *Am.J.Hum.Genet.* **59**, 529-539.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D.** (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 8392-8396.
- Pearson, M. A., Reczek, D., Bretscher, A., and Karplus, P. A.** (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* **101**, 259-270.
- Pelton, P. D., Sherman, L. S., Rizvi, T. A., Marchionni, M. A., Wood, P., Friedman, R. A., and Ratner, N.** (1998). Ruffling membrane, stress fiber, cell spreading and proliferation abnormalities in human Schwannoma cells. *Oncogene* **17**, 2195-2209.
- Prasad, G. L., Fuldner, R. A., and Cooper, H. L.** (1993). Expression of transduced tropomyosin 1 cDNA suppresses neoplastic growth of cells transformed by the ras oncogene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 7039-7043.
- Raff, M. C., Hornby-Smith, A., and Brockes, J. P.** (1978). Cyclic AMP as a mitogenic signal for cultured rat Schwann cells. *Nature* **273**, 672-673.
- Robbins, P. D., Tahara, H., and Ghivizzani, S. C.** (1998). Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* **16**, 35-40.
- Rodriguez Fernandez, J. L., Geiger, B., Salomon, D., and Ben Ze'ev, A.** (1993). Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. *J.Cell Biol.* **122**, 1285-1294.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown, P. O.** (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**, 2099-2108.
- Rosenbaum, C., Kluwe, L., Mautner, V. F., Friedrich, R. E., Muller, H. W., and Hanemann, C. O.** (1998). Isolation and characterization of Schwann cells from neurofibromatosis type 2 patients. *Neurobiol.Dis.* **5**, 55-64.
- Rouleau, G. A., Merel, P., Lutchman, M., Sanson, M., Zucman, J., Marineau, C., Hoang-Xuan, K., Demczuk, S., Desmaze, C., and Plougastel, B.** (1993). Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* **363**, 515-521.
- Rubio, M. P., Correa, K. M., Ramesh, V., MacCollin, M. M., Jacoby, L. B., von Deimling, A., Gusella, J. F., and Louis, D. N.** (1994). Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res.* **54**, 45-47.
- Rutkowski, J. L., Kirk, C. J., Lerner, M. A., and Tennekoon, G. I.** (1995). Purification and expansion of human Schwann cells in vitro. *Nat.Med.* **1**, 80-83.
- Rutledge, M. H., Sarrazin, J. , Rangaratnam, S., Phelan, C. M., Twist, E., Merel, P., Delattre, O., Thomas, G. , Nordenskjold, M., and Collins, V. P.** (1994). Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat.Genet.* **6**, 180-184.
- Rutledge, M. H., Andermann, A. A., Phelan, C. M., Claudio, J. O., Han, F. Y., Chretien, N., Rangaratnam, S., MacCollin, M., Short, P., Parry, D., Michels, V., Riccardi, V. M.,**

- Weksberg, R., Kitamura, K., Bradburn, J. M., Hall, B. D., Propping, P., and Rouleau, G. A.** (1996). Type of mutation in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) frequently determines severity of disease. *Am.J.Hum.Genet.* **59**, 331-342.
- Sainio, M., Zhao, F., Heiska, L., Turunen, O., den Bakker, M., Zwarthoff, E., Lutchman, M., Rouleau, G. A., Jaaskelainen, J., Vaheri, A., and Carpen, O.** (1997). Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton. *J.Cell Sci.* **110 (18)**, 2249-2260.
- Sainz, J., Huynh, D. P., Figueroa, K., Ragge, N. K., Baser, M. E., and Pulst, S. M.** (1994). Mutations of the neurofibromatosis type 2 gene and lack of the gene product in vestibular schwannomas. *Hum.Mol.Genet.* **3**, 885-891.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2. Auflage. Cold Spring Harbor, New York.
- Scherer, S. S. and Gutmann, D. H.** (1996). Expression of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, in Schwann cells. *J.Neurosci.Res.* **46**, 595-605.
- Schmucker, B., Ballhausen, W. G., and Kressel, M.** (1997). Subcellular localization and expression pattern of the neurofibromatosis type 2 protein merlin/schwannomin. *Eur.J.Cell Biol.* **72**, 46-53.
- Schmucker, B., Tang, Y., and Kressel, M.** (1999). Novel alternatively spliced isoforms of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor are targeted to the nucleus and cytoplasmic granules [published erratum appears in Hum Mol Genet 1999 Sep;8(9):1817]. *Hum.Mol.Genet.* **8**, 1561-1570.
- Scoles, D. R., Huynh, D. P., Morcos, P. A., Coulsell, E. R., Robinson, N. G., Tamanoi, F., and Pulst, S. M.** (1998). Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with betall- spectrin. *Nat.Genet.* **18**, 354-359.
- Scoles, D. R., Huynh, D. P., Chen, M. S., Burke, S. P., Gutmann, D. H., and Pulst, S. M.** (2000). The neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein interacts with hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Hum.Mol.Genet.* **9**, 1567-1574.
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U., and Bell, J. I.** (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 12160-12164.
- Sekido, Y., Pass, H. I., Bader, S., Mew, D. J., Christman, M. F., Gazdar, A. F., and Minna, J. D.** (1995). Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res.* **55**, 1227-1231.
- Sena-Esteves, M., Saeki, Y., Camp, S. M., Chiocca, E. A., and Breakefield, X. O.** (1999). Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. *J.Virol.* **73**, 10426-10439.
- Seol, D. W., Li, J., Seol, M. H., Park, S. Y., Talanian, R. V., and Billiar, T. R.** (2001). Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res.* **61** , 1138-1143.
- Shaw, R. J., McClatchey, A. I. , and Jacks, T.** (1998). Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *J.Biol.Chem.* **273**, 7757-7764.

- Sherman, L., Xu, H. M., Geist, R. T., Saporito-Irwin, S., Howells, N., Ponta, H., Herrlich, P., and Gutmann, D. H. (1997a). Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* **15**, 2505-2509.
- Sherman, L., Jacoby, L. B., Lampe, J., Pelton, P., Aguzzi, A., Herrlich, P., and Ponta, H. (1997b). CD44 expression is aberrant in benign Schwann cell tumors possessing mutations in the neurofibromatosis type 2, but not type 1, gene. *Cancer Res.* **57**, 4889-4897.
- Skladanowski, A. and Konopa, J. (1993). Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochem.Pharmacol.* **46**, 375-382.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* **23**, 628-633.
- Spector, D.L., Goldman, R.D., Leinwand, L.A. (1998) Cells (A Laboratory Manual) 1. Auflage. Cold Spring Harbor, New York.
- Stemmer-Rachamimov, A. O., Gonzalez-Agosti, C., Xu, L., Burwick, J. A., Beauchamp, R., Pinney, D., Louis, D. N., and Ramesh, V. (1997a). Expression of NF2-encoded merlin and related ERM family proteins in the human central nervous system. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* **56**, 735-742.
- Stemmer-Rachamimov, A. O., Xu, L., Gonzalez-Agosti, C., Burwick, J. A., Pinney, D., Beauchamp, R., Jacoby, L. B., Gusella, J. F., Ramesh, V., and Louis, D. N. (1997b). Universal absence of merlin, but not other ERM family members, in schwannomas. *Am.J.Pathol.* **151**, 1649-1654.
- Stemmer-Rachamimov, A. O., Wiederhold, T., Nielsen, G. P., James, M., Pinney-Michalowski, D., Roy, J. E., Cohen, W. A., Ramesh, V., and Louis, D. N. (2001). NHE-RF, a Merlin-Interacting Protein, Is Primarily Expressed in Luminal Epithelia, Proliferative Endometrium, and Estrogen Receptor-Positive Breast Carcinomas. *Am.J Pathol.* **158**, 57-62.
- Stokowski, R. P. and Cox, D. R. (2000). Functional Analysis of the Neurofibromatosis Type 2 Protein by Means of Disease-Causing Point Mutations. *Am.J.Hum.Genet.* **66**, 873-891.
- Teodoro, J. G. and Branton, P. E. (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *J.Virol.* **71**, 1739-1746.
- Tikoo, A., Varga, M., Ramesh, V., Gusella, J., and Maruta, H. (1994). An anti-Ras function of neurofibromatosis type 2 gene product (NF2/Merlin). *J.Biol.Chem.* **269**, 23387-23390.
- Trofatter, J. A., MacCollin, M. M., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Duyao, M. P., Parry, D. M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A. G., and Pulaski, K. (1993). A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* **75**, 826.
- Tsukita, S. and Yonemura, S. (1999). Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J.Biol.Chem.* **274**, 34507-34510.
- Twist, E. C., Rutledge, M. H., Rousseau, M., Sanson, M., Papi, L., Merel, P., Delattre, O., Thomas, G., and Rouleau, G. A. (1994). The neurofibromatosis type 2 gene is inactivated in schwannomas. *Hum.Mol.Genet.* **3**, 147-151.
- Vaheri, A., Carpen, O., Heiska, L., Helander, T. S., Jaaskelainen, J., Majander-Nordenswan, P., Sainio, M., Timonen, T., and Turunen, O. (1997). The ezrin protein family: membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 659-666.

- Wagstaff, M. J., Lilley, C. E., Smith, J., Robinson, M. J., Coffin, R. S., and Latchman, D. S.** (1998). Gene transfer using a disabled herpes virus vector containing the EMCV IRES allows multiple gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther.* **5**, 1566-1570.
- Wang, X., Martindale, J. L., and Holbrook, N. J.** (2000). Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **275**, 39435-39443.
- Weiss, R. A. and Tailor, C. S.** (1995). Retrovirus receptors. *Cell* **82**, 531-533.
- Wellenreuther, R., Kraus, J. A., Lenartz, D., Menon, A. G., Schramm, J., Louis, D. N., Ramesh, V., Gusella, J. F., Wiestler, O. D., and von Deimling, A.** (1995). Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am.J.Pathol.* **146**, 827-832.
- Wielenga, V. J., Heider, K. H., Offerhaus, G. J., Adolf, G. R., van den Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S. T.** (1993). Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* **53**, 4754-4756.
- Xu, H. M. and Gutmann, D. H.** (1998). Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. *J.Neurosci.Res.* **51**, 403-415.
- Xu, L., Gonzalez-Agosti, C., Beauchamp, R., Pinney, D., Sterner, C., and Ramesh, V.** (1998). Analysis of molecular domains of epitope-tagged merlin isoforms in Cos-7 cells and primary rat Schwann cells. *Exp.Cell Res.* **238**, 231-240.
- Yamazaki, Y., Tsuruga, M., Zhou, D., Fujita, Y., Shang, X., Dang, Y., Kawasaki, K., and Oka, S.** (2000). Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp.Cell Res.* **259**, 64-78.
- Zoidl, G., D'Urso, D., Blass-Kampmann, S., Schmalenbach, C., Kuhn, R., and Muller, H. W.** (1997). Influence of elevated expression of rat wild-type PMP22 and its mutant PMP22Trembler on cell growth of NIH3T3 fibroblasts. *Cell Tissue Res.* **287**, 459-470.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaar(e)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinder-Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy-DNA
CMK-7 Zellen	humane Megakaryoblasten-Leukämie-Zelllinie
cm	Zentimeter
Cy3	rot-fluoreszierendes Chromophor
DAPI	4-6-Diamidino-2-Phenylindol-di-hydrochlorid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>env</i>	retrovirales <i>envelope</i> -Gen, kodiert für Oberflächen-Glycoproteine
EGFP	grünfluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz aktiviertes Zell-Sortieren
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Diacetylfluorescein
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gravitationskonstante
<i>gag</i>	retrovirales Gen, kodiert für gruppenspezifische Antigene (Matrixproteine, Capsidproteine)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
hSC	humane Schwannzellen
IRES	interne Ribosomenbindestelle
k	Kilo
kb	Kilobasenpaar(e)

I	Liter
LOH	loss of heterozygosity
LTR	lange terminale Wiederholungen
m	milli
M	molar
μ	mikro
MCS	multiple Klonierungsstelle
MOI	multiplicity of infection, Verhältnis: Anzahl Viruspartikel/Zellzahl
min	Minute
mol	Mol
mRNA	messenger RNA
n	nano
NGS	Ziegenserum
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
<i>pol</i>	retrovirales <i>polymerase</i> -Gen, kodiert für Reverse Transkriptase, Integrase und Protease
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute
RS-Fibroblasten	primäre synoviale Kaninchen-Fibroblasten
RT	Raumtemperatur bzw. reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde
SC	Schwanzzellen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Zitratgepufferte Salzlösung
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/HCl-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	Tris/HCL-Borsäure Salzlösung
U	Unit(s)
V	Volt
W	Watt
(w/v)	weight for volume