

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF.DR.MED.DR.RER.NAT. A. GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NUTZUNG EINES LENTIVIRALEN EXPRESSIONSSYSTEMS ZUR
UNTERSUCHUNG DER MODULATION INTERFERON-STIMULIERTER GENE
DURCH DAS CYTOMEGALIEVIRUS IE1-PROTEIN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Reitberger

2014

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
PROF.DR.MED.DR.RER.NAT. A. GESSNER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

NUTZUNG EINES LENTIVIRALEN EXPRESSIONSSYSTEMS ZUR
UNTERSUCHUNG DER MODULATION INTERFERON-STIMULIERTER GENE
DURCH DAS CYTOMEGALIEVIRUS IE1-PROTEIN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Reitberger

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: PD. Dr. Michael Nevels
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
A. Einleitung.....	3
A.1. Das humane Cytomegalievirus (hCMV).....	3
A.1.1. Klassifizierung, Virionenstruktur und viraler Infektionszyklus.....	3
A.1.2. Epidemiologie und medizinische Bedeutung.....	4
A.1.3. Diagnostik	6
A.1.4. Antivirale Prävention und Therapie.....	7
A.2. Das IE1-Protein.....	9
A.3. Interferone und Interferon-stimulierte Gene.....	11
A.3.1. Interferone	11
A.3.2. Der CXCR3-Rezeptor, seine Liganden und GBP4	12
A.4. Fragestellung.....	13
B. Material und Methoden.....	15
B.1. Material.....	15
B.1.1. Antikörper	15
B.1.2. Oligonukleotide	16
B.1.3. siRNAs	17
B.1.4. Plasmide.....	17
B.1.5. Zellen und Viren.....	18
B.1.5.1. Escherichia coli-Stämme.....	18
B.1.5.2. Humane Zellen	18
B.1.5.3. Viren.....	19

B.1.6.	Zytokine.....	20
B.2.	Methoden.....	21
B.2.1.	Nukleinsäure-Methoden	21
B.2.1.1.	Kultivierung und Lagerung von E.coli-Kulturen	21
B.2.1.2.	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	21
B.2.1.3.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
B.2.1.4.	Restriktionsanalyse	22
B.2.1.5.	Agarosegelektrophorese.....	22
B.2.1.6.	Gesamt-RNA-Isolierung.....	23
B.2.1.7.	Gesamt-DNA-Isolierung	23
B.2.1.8.	Reverse Transkription.....	24
B.2.1.9.	qPCR.....	25
B.2.2.	Proteinbiochemische Methoden	26
B.2.2.1.	Herstellung von Gesamzellextrakten.....	26
B.2.2.2.	SDS-PAGE und Western Blot-Analyse.....	27
B.2.2.3.	(Immun-)Fluoreszenzmikroskopie	28
B.2.3.	Zellkulturverfahren.....	30
B.2.3.1.	Kultivierung humaner Zellen	30
B.2.3.2.	Gewinnung von PBMCs und IL2-Stimulation	32
B.2.3.3.	Testung von Zellkulturen auf Mykoplasmen.....	33
B.2.3.4.	Kollagenbeschichtung von Kulturgefäßen	33
B.2.3.5.	Gewinnung von konditioniertem Medium	34
B.2.3.6.	Transfektion und Transduktion humaner Zellen	34
B.2.3.6.1.	Kalziumphosphatpräzipitation.....	34

B.2.3.6.2.	Transduktion humaner Zellen mit Lentiviren.....	36
B.2.3.6.3.	siRNA-Transfektion mittels Lipofektion	37
B.2.3.7.	TCID ₅₀ mittels Plaque-Assay.....	37
B.2.3.8.	Infektion von MRC5-Zellen und HUVEC mit dem hCMV-FX-Stamm .	38
B.2.3.9.	Adhäsionstest.....	38
C. Ergebnisse	40	
C.1.	Optimierung der Herstellung transgener Zelllinien mit Hilfe rekombinanter Lentiviren	40
C.1.1.	Überblick	40
C.1.2.	Grundprinzip der Herstellung transgener Zelllinien	41
C.1.3.	Rekombinante Vektoren zur Lentivirusproduktion.....	42
C.1.4.	Charakterisierung der verwendeten Plasmide durch Restriktionsverdau ...	45
C.1.5.	Zeitlicher Ablauf der Produktion transgener Zelllinien.....	47
C.1.6.	Effiziente Produktion rekombinanter Lentiviren in 293T-Zellen.....	48
C.1.7.	Ultrazentrifugierte Lentivirus-Stocks verbessern die Transduktionsrate....	49
C.1.8.	Keine verbesserte Lentivirusaufnahme durch Zentrifugation während der Transduktion.....	51
C.1.9.	Zusammenfassung	52
C.2.	Untersuchung der IE1-Antwort in humanen Fibroblasten	53
C.2.1.	Überblick	53
C.2.2.	Expression des IE1-Proteins führt zu Aktivierung der humanen Gene CXCL10, CXCL11 und GBP4	54
C.2.3.	IE1 induziert eine IFN γ -ähnliche Antwort.....	55
C.2.4.	Einfluss des IE1-Proteins auf die Expression der CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in Fibroblasten.....	56

C.2.5. Langzeitinduktion von IE1 in Fibroblasten zeigt eine maximale Expression von CXCL10 und GBP4 nach 10 Tagen.....	57
C.2.6. IE1-Präexpression hat nur geringen Einfluss auf die Aktivierung von CXCL10 durch IFN γ	59
C.2.7. Kein synergistischer Effekt der IE1-Expression auf die Gleichgewichtsmenge von CXCL10 nach IFN γ -Stimulation	61
C.2.8. Expression von IE1 hat keinen Einfluss auf die Kinetik der ISG-Aktivierung nach IFN γ -Stimulation	62
C.2.9. Kein Einfluss von IFN-neutralisierenden Antikörpern auf die IE1-vermittelte Aktivierung humaner Gene.....	64
C.2.10. Geringer Einfluss des IFN γ -Rezeptor Knockdown auf die IE1-vermittelte Aktivierung humaner Gene.....	65
C.2.11. Sekretom aus induzierten TetR-IE1-Zellen fördert die Infektion von MRC5 mit klinischem hCMV-Isolat.....	68
C.2.12. Zusammenfassung	69
C.3. Untersuchung der IE1-Antwort in humanen Endothelzellen und ihre Auswirkung auf die Adhäsion von Blutzellen.....	70
C.3.1. Überblick	70
C.3.2. HUVEC-Kulturen sind Mykoplasmen-frei.....	71
C.3.3. HUVEC sind mit klinischem hCMV-Isolat infizierbar	72
C.3.4. Herstellung und Charakterisierung von TetR-IE1-HUVEC.....	73
C.3.5. Nachweis einer Typ II IFN-ähnlichen Antwort nach IE1-Expression in HUVEC	75
C.3.6. Nachweis von CXCR3 auf KG1-Zellen und PBMC	77
C.3.7. TNF α vermittelt im Gegensatz zu IFN γ die Adhäsion verschiedener monozytärer Zellen.....	78

C.3.8. IE1-Expression hat keinen Effekt auf die Adhäsion verschiedener monozytärer Zellen.....	80
C.3.9. Zusammenfassung	81
D. Diskussion	82
D.1. Notwendigkeit eines induzierbaren Systems zur Untersuchung von IE1-Funktionen	82
D.2. Mögliche Mechanismen der IE1-vermittelten ISG-Induktion.....	83
D.3. Das Zusammenspiel von HUVEC und CXCR3 bei der hCMV-Pathogenese.....	85
D.3.1. Rolle von Endothelzellen bei der hCMV-Infektion	85
D.3.2. Bedeutung der CXCR3-Achse für hCMV-Infektion und Zelladhäsion.....	86
D.3.3. CXCR3 und die hCMV-Pathogenese in der Klinik.....	87
E. Anhang	89
E.1. Abkürzungsverzeichnis.....	89
E.2. Literaturverzeichnis	91
E.3. Abbildungsverzeichnis.....	111
E.4. Tabellenverzeichnis.....	112
Danksagung	113

Zusammenfassung

Das humane Cytomegalievirus (hCMV) ist ein hochprävalentes Herpesvirus mit weitreichender medizinischer Bedeutung. Es verursacht bei Immunsupprimierten (AIDS-, Transplantationspatienten) lebensbedrohliche Erkrankungen und ist die häufigste infektiöse Ursache kongenitaler Fehlbildungen bei Infektion in der Schwangerschaft. Eine anwendbare Impfprophylaxe existiert derzeit noch nicht und auch das Spektrum der medikamentösen Therapiemöglichkeiten beschränkt sich auf einige wenige Ansätze.

Das immediate early 1-Protein (IE1) ist ein viraler Schlüsselregulator und beeinflusst unter anderem differentiell die Genexpression in der infizierten Wirtszelle. Besonders in der Frühphase der Infektion hat IE1 entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der hCMV-Replikation und -Pathogenese.

Ein Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von IE1 auf die Expression von CXC-Chemokinen und anderen Interferon (IFN) γ -stimulierten Genen und eine damit möglicherweise verbundene Adhäsion von Immunzellen in verschiedenen humanen Zellen zu untersuchen. Zu Beginn wurde ein zuverlässiges und effizientes Protokoll für die Herstellung induzierbar IE1-exprimierender Zelllinien mit Hilfe von lentiviralem Gentransfer erstellt. Somit gelang es die zelluläre Antwort auf eine isolierte IE1-Expression in Fibroblasten zu untersuchen. Weitere Untersuchungen ergaben detaillierte Erkenntnisse zu dem Zeitverlauf und anderen Charakteristika der Genstimulation. Ebenso konnte eine von IFN und dem IFN-Rezeptor weitgehend unabhängige Aktivierung der IFN-stimulierten Gene durch IE1 nachgewiesen werden. Erstmals konnte auch in physiologisch relevanteren transgenen Endothelzellen gezeigt werden, dass die IE1-Expression eine IFN γ -ähnliche Antwort erzeugt. Die biologische Relevanz der primär untersuchten CXCR3-Achse sollte mit Hilfe eines in dieser Arbeit etablierten Adhäsionstests geklärt werden, wobei sich unter den gewählten experimentellen Rahmenbedingungen keine Adhäsion während zellulärer IE1-Expression nachweisen ließ.

Schließlich ließ sich ein Modell zum Mechanismus der Genaktivierung durch IE1 entwickeln, wobei zur endgültigen Klärung noch weitere Untersuchungen nötig sein werden. Insgesamt konnte durch diese Arbeit ein Beitrag zur Aufklärung früher zellulärer Reaktionen auf eine hCMV-Infektion geleistet werden, der in künftige Therapiekonzepte Eingang finden könnte.

A. Einleitung

A.1. Das humane Cytomegalievirus (hCMV)

A.1.1. Klassifizierung, Virionenstruktur und viraler Infektionszyklus

hCMV, synonym humanes Herpesvirus 5 (HHV5) genannt, ist einer von acht humanpathogenen Vertretern der Familie der Herpesviridae und gehört der Unterfamilie der β -Herpesvirinae an. Diese zeichnen sich durch relativ lange Replikationszeiten (mehrere Tage) und strikten Wirtstropismus aus (Modrow et al. 2010; Koszinowski 2010). hCMV besitzt einen breiten Zelltropismus. In vitro gelten humane Fibroblasten als Standardkultur, wobei physiologisch relevantere Zellen für die Pathogenese vor allem Endothel- und hämatologische Zellen sind (Gerna et al. 2004; Revello und Gerna 2010). Mit 235 kbp Doppelstrang-DNA besitzt hCMV das größte Genom unter den humanen Herpesviren, welches für etwa 165 Gene kodiert (Murphy und Shenk 2008; Koszinowski 2010). Die Nomenklatur der Gene richtet sich nach ihrer Position in der unique long- (U_L) oder unique short- (U_S) Region, bzw. in den terminal repeat- (TR_L, TR_S) oder internal repeat- (IR_L, IR_S) Bereichen (jeweils long oder short). Das Genom befindet sich in Virionen im Inneren eines ikosaedrischen Kapsids, das wiederum von einer als Tegumentschicht bezeichneten Proteinmatrix sowie einer Lipidhülle mit eingelagerten viralen Glykoproteinen umgeben ist (Mocarski et al. 2007). Das gesamte Viruspartikel hat einen Durchmesser von ca. 200 nm (Mocarski et al. 2007). Zu Beginn einer Infektion kommt es nach einer Anheftung des Virions an die Zelloberfläche, je nach Zelltyp sofort (Mocarski et al. 2007) oder erst nach Rezeptor-vermittelter Endozytose (Ryckman et al. 2006) zu einer Membranfusion, woraufhin Kapsid- und Tegumentproteine ins Zytosol der Wirtszelle entlassen werden. Anschließend erfolgt der Transport des Kapsids zum Kern mit Hilfe des Mikrotubuli-Netzwerkes (Sodeik et al. 1997), wobei auch Aktin- und Intermediärfilamente beteiligt zu sein scheinen (Miller und Hertel 2009). Die viralen Nukleokapside binden

schließlich an die Kernporen und die viralen Genome werden in das Nukleoplasma entlassen (Ojala et al. 2000). Im Kern kommt es zur Zirkularisierung der viralen DNA und anschließend zu einer Replikation durch die virale DNA-Polymerase nach dem Prinzip des „rolling circle“ (McVoy und Adler 1994). Die Transkription der viralen Gene erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase II und findet in einem dreiphasigen, kaskadenartigen Verlauf statt: der sehr frühen Phase (immediate-early, IE), der frühen Phase (early, E) und der späten Phase (late, L) (Stinski 1978). Die IE-Proteine werden sofort nach Eintritt des Genoms in den Wirtszellkern exprimiert und sind auf folgende vier Regionen des hCMV-Genoms verteilt: U_L36-37, U_L122-123 (IE1 und IE2), Us3 sowie TRs1/IRs1. Sie wirken unter anderem als Transaktivatoren auf die Expression der E- und L-Gene. Die E-Proteine werden für die virale DNA-Replikation benötigt, an der mindestens 23 verschiedene viruskodierte Genprodukte beteiligt sind. Die L-Gene, deren Expression von der viralen DNA-Replikation abhängt, kodieren hauptsächlich für Strukturkomponenten des Viruspartikels, aber auch für Regulatoren der Kapsidreifung und der DNA-Verpackung. Somit tragen die späten Genprodukte zur Virionenmorphogenese und anschließenden Freisetzung der Viruspartikel aus der Zelle bei (Mocarski et al. 2007). Ein weiteres Charakteristikum von hCMV ist, wie bei der gesamten Familie der Herpesviren, die Etablierung einer Latenz mit sehr eingeschränktem Transkriptionsprofil und ohne Virionenproduktion als Alternative zum produktiven Infektionszyklus (Reeves und Sinclair 2008; Sinclair 2008; Goodrum et al. 2012).

A.1.2. Epidemiologie und medizinische Bedeutung

In Abhängigkeit von Alter und sozioökonomischem Status beträgt die Seroprävalenz von hCMV weltweit zwischen 45% und 100% (Cannon et al. 2010). Die höchste Seroprävalenz findet sich hierbei in Schwellenländern mit annähernd 100% (Njeru et al. 2009; Souza et al. 2010), die niedrigste in den USA und Deutschland mit etwa 50% (Bate et al. 2010; Lübeck et al. 2010; Ludwig und Hengel 2009). Die Übertragung kann horizontal durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion bei Austausch von Körpersekreten (Speichel, Urin, Blut,

Zervixsekret, Samen- und Tränenflüssigkeit), vertikal über transplazentare Infektion oder die Muttermilch, sowie iatrogen im Rahmen von Bluttransfusionen und Organtransplantationen stattfinden (Boppana und Fowler 2007; Cannon et al. 2011; Mehler et al. 2014). Eine hCMV-Neu- oder -Reinfektion verläuft bei Immunkompetenten überwiegend asymptomatisch, selten tritt eine Mononukleose-ähnliche Symptomatik auf, welche sich klinisch durch Fieber, Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie, Ikterus, Transaminasenanstieg, atypische Lymphozytose usw. präsentieren kann (Mocarski et al. 2007). Wesentlich schwerwiegendere generalisierte Infektionsverläufe treten bei Menschen auf, deren Immunsystem noch nicht vollständig ausgebildet oder geschwächt ist (Sinzger und Jahn 1996). Durch den breiten Zelltropismus und die hämatogene Dissemination kann es in solchen Fällen zu einer makroinflammatorischen Reaktion in praktisch jedem Organ kommen (Doerr 2010).

Bei einer Primärinfektion der Mutter in der Frühschwangerschaft kommt es in circa 30% bis 40% der Fälle zu einer Infektion des Fetus (Rahav 2007). Von den intrauterin infizierten Kindern können bis zu 90% klinisch unauffällig bleiben, jedoch entwickeln sie in 10% bis 15% bleibende Folgeschäden in Form von psycho-motorischer Entwicklungsstörung, geistiger Retardierung oder (am häufigsten) sensoneuralem Hörverlust (Nigro 2009). Unter den bis zu 20% klinisch symptomatischen Neugeborenen kommt es in 40% bis 58% der Fälle zu bleibenden Spätschäden, außerdem ist eine hCMV assoziierte Letalität von bis zu 20% in diesem Patientenkollektiv beschrieben (Fowler et al. 1992; Modlin et al. 2003; Dahle et al. 2000; Dollard et al. 2007). Dementsprechend ist hCMV die häufigste infektiöse Ursache für Geburtsdefekte und Hörverlust im Kindesalter und stellt mit einer gemittelten Infektionsrate von 0,64% aller Lebendgeburten gleichzeitig die häufigste kongenitale virale Infektion überhaupt dar (Kenneson und Cannon 2007). Eine Reaktivierung oder erneute Infektion von hCMV in der Schwangerschaft führt in etwa 1,4% zu einer Infektion des Feten (Kenneson und Cannon 2007). Bei Geburt finden sich meist keine Anzeichen einer klinischen Manifestation (Fowler et al. 1992), allerdings entwickeln bis zu 8% der Kinder im Verlauf Spätschäden (Fowler et al. 1992; Nigro 2009). Eine peri- oder postnatale Infektion durch virushaltiges Sekret im Geburtskanal oder in der Muttermilch enthaltenes hCMV stellt hauptsächlich für frühgeborene Kinder ein Problem dar (Kurath et al. 2010).

Durch eine iatrogene Immunsuppression nach Transplantationen von soliden Organen, Knochenmark oder Stammzellen, kann es auch zu einer Primärinfektion oder Reaktivierung des latenten hCMV kommen. Die klinische Manifestation kann hier von einer eher harmlosen Fieberreaktion bis hin zu schwerwiegenden Organerkrankungen, wie interstitieller Pneumonie, Kolitis, Hepatitis, Retinitis oder Enzephalitis reichen, welche mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen. Sowohl eine Primärinfektion als auch die Reaktivierung kann zu einer Abstoßung des Transplantats führen (Ljungman et al. 2002; Indolfi et al. 2012; van Ree et al. 2011; Kute et al. 2012). Auch bei HIV-positiven Patienten kann im acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) Stadium eine Primärinfektion oder Reaktivierung von hCMV sehr schwere Krankheitsverläufe hervorrufen. Die häufigste Manifestationsform ist hier die Retinitis, gefolgt von gastrointestinalen und zentralnervösen Entzündungen. Allerdings gelang es durch die Einführung der HAART (highly active antiretroviral therapy) diese gefürchteten Komplikationen einzudämmen, sodass sie aktuell nur noch bei Patienten auftreten, die keine solche Therapie bekommen oder nicht darauf ansprechen (Boeckh und Geballe 2011).

Neben sehr akuten Krankheitsverläufen fanden sich auch Hinweise, dass eine chronische hCMV-Infektion in möglicher kausaler Beziehung zu der Genese und Onkmodulation verschiedener Tumorerkrankungen steht (Michaelis et al. 2009; Michaelis et al. 2011; Dziurzynski et al. 2012; Soroceanu und Cobbs 2011; Johnsen et al. 2011). Weitere Assoziationen der chronischen hCMV-Infektion mit anderen Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose, Transplantatabstösungen, arterieller Hypertension, chronisch entzündlichen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen werden derzeit untersucht (Cheng et al. 2009; Caposio et al. 2011).

A.1.3. Diagnostik

Zur Testung auf eine hCMV-Infektion können Blut, Urin, Speichel oder Gewebeproben verwendet werden (Boeckh und Boivin 1998; Mocarski et al. 2007). Der Gold-Standard ist

die polymerase chain reaction (PCR), welche eine hohe Sensitivität aber auch Spezifität aufweist (Wolff et al. 2009; Drebber et al. 2011). Eine weitere wichtige diagnostische Möglichkeit ist die Testung auf hCMV-spezifische Antikörper im Serum (Paschale et al. 2010). In der Histopathologie kann man die pathognomonischen „Eulenaugenzellen“ erkennen, allerdings findet diese Methode weniger Anwendung (Bellamy 1954). Eine direkte Isolierung des Virus ist genauso möglich wie ein Nachweis durch Infektion einer Zellkultur, wobei dies einige Zeit dauert (Boeckh und Boivin 1998).

A.1.4. Antivirale Prävention und Therapie

Neben allgemeinen Verhaltensempfehlungen für Risikopersonen (Schwangere, Transplantationspatienten, etc.), wie Hygienemaßnahmen, wird auch die Option einer Impfprophylaxe intensiv untersucht. Hierbei reicht die Bandbreite von attenuierten Lebendimpfstoffen aus laboradaptierten hCMV-Stämmen bis zur Immunisierung mit einzelnen viralen Antigenen (Schleiss 2008). Mehrere dieser Impfstoffe wurden bereits in klinischen Studien erfolgreich getestet (Schleiss 2008; Kharfan-Dabaja et al. 2012). Allerdings ist noch nicht klar, ob jeder Impfstoff für die verschiedenen Risikogruppen gleich gut geeignet wäre. Es fehlte zusätzlich lange Zeit auch an politischem und industriellem Interesse, um die Evidenz für hCMV-Impfungen auf eine solide Basis zu stellen. Neben einer aktiven Impfung besteht auch die Möglichkeit einer passiven Immunisierung mittels spezifischen Immunglobulinen (Planitzer et al. 2011; Adler und Nigro 2013). Zur systemischen Therapie sind einige niedermolekulare Moleküle, wie die Nukleosidanaloge Ganciclovir und dessen Estererivat Valganciclovir, Aciclovir und Valaciclovir sowie Cidofovir und das Pyrophosphonatanalogon Foscarnet im Einsatz. Daneben stehen das antisense-Therapeutikum Fomivirsin und als off-label Gebrauch Leflonomide zur Verfügung (Schreiber et al. 2009; Gandhi und Khanna 2004; Boeckh und Geballe 2011). Ganciclovir und das oral besser verfügbare Valganciclovir werden in infizierten Zellen durch die viruseigene Kinase (UL97-Genprodukt) monophosphoryliert (Sullivan et al. 1992), durch zelluläre Kinasen triphosphoryliert und in dieser Form von der

viralen DNA-Polymerase (U_{L54} -Genprodukt) als Substrat verwendet. Hierdurch erfolgt der Abbruch des Polymerisationsvorgangs (Oram und Herold 1998). Die limitierenden Nebenwirkungen sind Hämatotoxizität in Form einer Neutropenie und Thrombozytopenie. In Tierstudien fanden sich auch Hinweise auf eine karzinogene und teratogene Wirkung dieser Präparate (Boeckh et al. 1996; Paya et al. 2004; Martin et al. 2002; Boeckh und Geballe 2011). Aciclovir und dessen Derivat Valaciclovir sind hinsichtlich des Wirkmechanismus vergleichbar mit Ganciclovir, wobei die Akzeptanz der viralen DNA-Polymerase für Aciclovir geringer ist, und somit eine deutlich schlechtere Wirksamkeit resultiert. Daher wird Aciclovir vor allem zur prophylaktischen hCMV-Therapie nach Organtransplantationen und weniger bei einer akuten Infektion eingesetzt.

Ist es aufgrund von Resistenzentwicklungen oder unerwünschten Nebenwirkungen nicht möglich Ganciclovir einzusetzen, können die beiden Alternativpräparate Cidofovir (Cytidinanalagon) oder Foscarnet (Pyrophosphonatanalogen) eingesetzt werden. Cidofovir wird ausschließlich von zellulären Kinasen aktiviert und hat als schwerwiegendste Nebenwirkung eine ausgeprägte irreversible Nephrotoxizität, sodass es bei Transplantationspatienten kaum eingesetzt wird (Mercorelli et al. 2008). Foscarnet bedarf zur Hemmung der viralen DNA-Polymerase keiner weiteren intrazellulären Aktivierung, die Nebenwirkungen bestehen hier aus Elektrolytentgleisungen, Nephrotoxizität und Krampfanfällen (Reusser et al. 2002; Palestine et al. 1991). Das antisense-Präparat Fomivirsen kam vor allem bei hCMV-Retinitis bei AIDS-Patienten zur Anwendung, wo es lokal in den Glaskörper des Auges appliziert wurde. Die antisense-DNA ist hierbei spezifisch gegen die mRNA von IE2, einem Hauptaktivator der lytischen Replikation, gerichtet (Mercorelli et al. 2011).

Weitere noch nicht zugelassene Medikamente wie Maribavir, das über eine Hemmung der U_{L97} -Kinase wirkt oder einige Benzimidazol D-Riboside, welche die Prozessierung der viralen DNA hemmen, befinden sich in klinischen Studien (Lurain und Chou 2010). Diese zeigten für Maribavir eine unzureichende Wirksamkeit (Marty et al. 2011). Letermovir stellt eine neue Alternative dar. Ziel dieses Medikaments ist eine Untereinheit des viralen Terminasekomplexes (Chemaly et al. 2014). Für die experimentelle Therapie von

multiresistenten hCMV-Stämmen werden unter anderem Leflunomide (Inhibitoren von Proteinkinasen und der Pyrimidin Synthese aus der rheumatoiden Arthritis-Therapie), Artesunate (Anti-Malaria-Medikamente) oder immunsuppressive Therapeutika, wie Sirolimus, mit Erfolg angewendet (Lurain und Chou 2010; Qi et al. 2013). Trotz allem ist es weiterhin schwierig schwerwiegende hCMV-Infektionen zu therapieren.

A.2. Das IE1-Protein

Das 72 kDa schwere immediate-early 1-Protein (IE1) des humanen Cytomegalievirus ist das erste neusynthetisierte virale Protein, das nach dem Eindringen des Virus in die Wirtszelle nachweisbar ist. IE1 akkumuliert in großen Mengen im Zellkern. Die IE1-mRNA entsteht durch differentielles Spleißen eines Primärtranskripts, das auch für das IE2-Protein kodiert. Beide Phosphoproteine stellen promiskuitive transkriptionelle Regulatoren dar, welche für eine effiziente Virusvermehrung notwendig sind. IE2 ist der wichtigste Aktivator des lytischen Infektionszyklus von hCMV und essentiell für eine produktive Virusreplikation (Marchini et al. 2001). Die Rolle von IE1 ist in diesem Zusammenhang weniger eindeutig, da Virusmutanten mit spezifischen Deletionen der IE1-Sequenz unter hohen Infektionsmultiplizitäten (multiplicities of infection, MOI) eine effiziente Replikation zeigen. Ist die MOI aber niedrig, so führt das Fehlen von IE1 zu einer Expressionsblockade viraler E-Gene, und somit zu einer abgeschwächten Virusproduktion (Gawn und Greaves 2002; Greaves und Mocarski 1998; Mocarski et al. 1996). Diese Beobachtung deutet auf eine Schlüsselfunktion von IE1 besonders in der frühen Phase der hCMV-Infektion hin, welche entscheidend für den Erfolg der weiteren produktiven Infektion ist.

IE1 kann in seiner Rolle als allgemeiner Transaktivator neben viralen Genen auch zahlreiche zelluläre Gene aktivieren (Mocarski et al. 2007; Paulus und Nevels 2009; Castillo und Kowalik 2002). So bindet IE1 an Chromatin (Lafemina et al. 1989) und interagiert mit einer Vielzahl von Regulatorproteinen der Transkription (Nevels et al. 2004; Hwang et al.

2009; Hayhurst et al. 1995). Außerdem kolokalisiert es mit subnukleären Multiproteinkomplexen, die als PML (promyelocytic leukemia)-Körper oder ND10 (nuclear domain 10) bekannt sind (Maul 2008; Tavalai und Stamminger 2009; Ahn und Hayward 1997).

IE1 moduliert zusätzlich auf vielfältige Art und Weise die Immunantwort der Zelle im Rahmen einer hCMV-Infektion. So blockiert eine starke IE1-Expression den Typ I IFN-Signalweg auf der Ebene der Interaktion zwischen IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3) und der Ziel-DNA (Paulus et al. 2006). Es findet hierbei eine Kolokalisation mit den Proteinen der signal transducer and activator of transcription (STAT)1 und 2 statt (Paulus et al. 2006). Für die Interaktion von IE1 mit STAT2 wird die carboxy-terminale saure Region von IE1 benötigt (Huh et al. 2008). Fehlt dieser Teil des Proteins kommt es zu einer eingeschränkten Virusproduktion unter dem Einfluss von Typ I IFN (Huh et al. 2008). Die carboxy-terminale Region von IE1 scheint auch bei der Beeinflussung der IFN γ -Antwort in hCMV infizierten Zellen notwendig zu sein (Raghavan et al. 2014). Der Einfluss von STAT1 in diesem Zusammenhang ist nicht endgültig geklärt. Zum einen wurde eine verminderte Bindung von STAT1 Homodimeren an IFN γ activated sites (GAS) gefunden, welche durch IE1 mittels eines ungeklärten Mechanismus vermittelt wird (Raghavan et al. 2014). Zum anderen wurde eine IFN γ -ähnliche Genaktivierung durch IE1 festgestellt, bei der die Anwesenheit von aktiviertem STAT1 notwendig ist (Knoblauch et al. 2011). Parallelen zu diesen Beobachtungen finden sich bei der Interaktion zwischen Interleukin (IL)6 und IE1. IE1 beeinflusst hier den durch IL6 aktivierte STAT3-Signalweg, indem es den Transport von STAT3 in den Zellkern fördert, allerdings wird die Expression der IL6-abhängigen Gene dann gehemmt (Reitsma et al. 2013). Die gezielte Modulation der Immunantwort nach hCMV-Infektion durch IE1 ist ein komplexer Prozess, der bisher nur in Teilen verstanden ist (Amsler et al. 2013).

Zusätzlich wurde dem IE1-Protein auch antiapoptotisches, mutagenes, onkogenes und mitogenes Potential zugeschrieben (Castillo und Kowalik 2002; Zhu et al. 1995).

A.3. Interferone und Interferon-stimulierte Gene

A.3.1. Interferone

Interferone (IFN) sind α -helikale Zytokine, welche in drei verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Typ I IFN stellen mit den Hauptvertretern IFN α und IFN β die größte Unterfamilie der IFN dar (Taniguchi et al. 1980; Stark et al. 1998; Pestka et al. 2004).

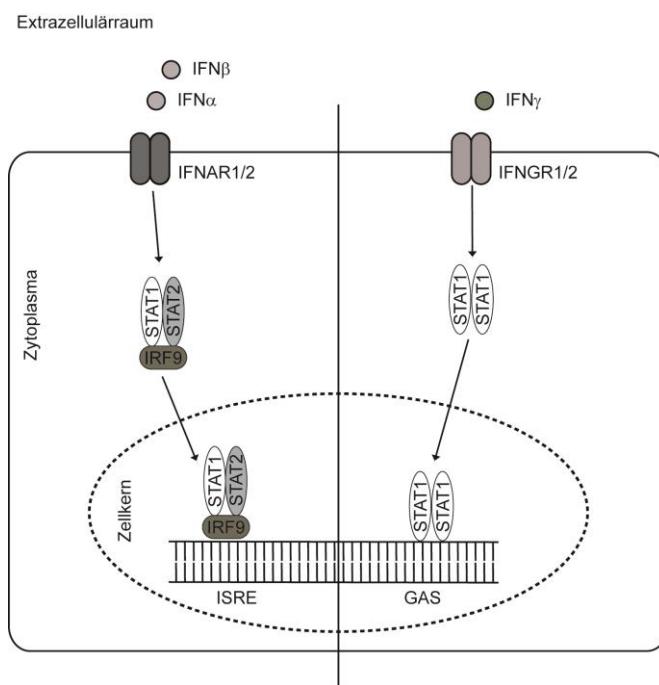


Abbildung 1: Schematische Darstellung der IFN-Signalwege

IFN (α/β bzw. γ) binden an den zugehörigen IFN-Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dies induziert eine Dimerisierung von STAT. Diese bilden bei dem IFN α/β -Signalweg einen Komplex mit IRF9, bevor sie im Zellkern die zugehörigen ISRE aktivieren. Im IFN γ Signalweg vermitteln die STAT1-Homodimere die Transkription ausgewählter Gene an GAS.

Sie aktivieren die Signaltransduktion über den Rezeptor IFNAR1/2 (Novick et al. 1994) und induzieren hauptsächlich einen Komplex aus STAT1, STAT2 und IRF9 (IFN regulatory factor 9), den heterotrimeren ISGF3. Wie in Abbildung 1 (S. 11) zu sehen, bindet dieser nach Einschleusung in den Zellkern ISRE (IFN-stimulated response element)-Sequenzen in

Promotoren und induziert somit die Expression der Zielgene (van Boxel-Dezaire et al. 2006; Schindler und Plumlee 2008). Eine Vielzahl der Typ I ISGs kodiert für antivirale Genprodukte. Typ II IFN bestehen nur aus ihrem einzigen Vertreter IFN γ , welcher hauptsächlich von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert wird und starke immunmodulatorische Eigenschaften besitzt (Bonjardim et al. 2009). Über eine Bindung an den Oberflächenrezeptor IFN γ R1/2 vermittelt IFN γ überwiegend die Bildung von STAT1-Homodimeren, welche nach Translokation in den Zellkern an GAS binden und somit eine Transkription ausgewählter ISG fördern (Schindler et al. 2011; Schroder et al. 2004). Typ III IFN oder IFN λ gehören vermutlich zu den ältesten antiviralen Zytokinen (Levraud et al. 2007), zu deren bekannten Vertretern IL29, IL28A und IL28B gehören (Kotenko et al. 2003; Sheppard et al. 2003). Sie modulieren die Zellproliferation und hemmen die Virusreplikation (Onoguchi et al. 2007; Dumoutier et al. 2004).

A.3.2. Der CXCR3-Rezeptor, seine Liganden und GBP4

Eine Gruppe von ISGs stellen Chemokine mit N-terminalem C-X-C-Motif (Zlotnik und Yoshie 2000) dar. Ziel bestimmter CXC-Liganden ist CXCR3, ein G-Protein gekoppelter CXCR Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, welcher in großen Mengen vor allem auf aktivierten T-Lymphozyten gefunden wird. Ansonsten ist er nur auf einer geringen Anzahl ruhender T-Zellen, B-Zellen, Granulozyten oder Monozyten vertreten (Loetscher et al. 1996; Trentin et al. 1999; Singh et al. 2012). Die drei Chemokine CXCL9 (monokin induced by human IFN γ , MIG), CXCL10 (IFN induced protein of 10 kDa, IP-10) und CXCL11 (IFN inducible T cell alpha chemoattractant, I-TAC) binden an CXCR3 und induzieren Chemotaxis der T-Lymphozyten (Cole et al. 1998). Es existieren mindestens zwei Spleiß-Varianten von CXCR3, CXCR3A und CXCR3B, welche für die gegensätzlichen Funktionen des Rezeptors in verschiedenen Geweben verantwortlich gemacht werden. So fördert die Expression von CXCR3A auf Epithelzellen die Zellproliferation, wohingegen CXCR3B auf Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen Zellmigration und Apoptose inhibiert (Singh et al. 2012; Lasagni et al. 2003; Datta et al. 2006; Datta et al. 2008). Eine

weitere Spleiß-Variante, CXCR3 alt, wird oft mit CXCR3A coexprimiert und fördert die Migration der Zellen nach Stimulation durch CXCL9, CXCL10 oder CXCL11 (Ehlert et al. 2004; Lasagni et al. 2003). Generell kann man sagen, dass das CXCR3-Liganden System eine zwiespältige Rolle bei der Regulation von Zellwachstum bzw. Tumorgenese, Angiogenese, Autoimmunerkrankungen und verschiedensten infektiösen Erkrankungen spielt (Liu et al. 2011; Suyama et al. 2005; Rotondi et al. 2003).

Das guanylate binding protein 4 (GBP4) ist Mitglied der Gruppe von IFN-induzierbaren GTPasen, über die bislang erst wenig bekannt ist. Es wird angenommen, dass es durch Interaktion mit IFN regulatory factor 7 (IRF7) die Typ I IFN-Induktion hemmt (Hu et al. 2011). Außerdem hat man beobachtet, dass die GBP4-Genexpression durch die Präsenz des hCMV-IE1-Proteins induziert wird (Knoblauch et al. 2011).

A.4. Fragestellung

hCMV ist ein weltweit hochprävalentes Pathogen, welches trotz medizinischer Fortschritte immer noch ein großes Problem für Immunsupprimierte und Kinder im Mutterleib darstellt und dessen Pathogenese weiterhin an vielen Stellen unklar ist. Bereits die initiale Expression von viralen IE-Proteinen in humanen Fibroblasten fördert eine IFN γ -ähnliche Genexpression, bei der vor allem CXCR3-Liganden aktiviert werden. Um reproduzierbar die isolierte Auswirkung von IE1 auf humane Zellen untersuchen zu können, ist ein Teilziel dieser Arbeit die Ausarbeitung eines zuverlässigen und effizienten Protokolls für die Herstellung induzierbar IE1-exprimierender Zelllinien mit Hilfe von lentiviralem Gentransfer. Die bereits teilweise bekannte Genantwort von humanen Fibroblasten auf IE1 soll anschließend noch einmal überprüft werden. Der Einfluss von IE1 auf die ISG-Expression nach IFN γ -Gabe wird hierbei ebenso untersucht, wie die Rolle des IFN-Rezeptors im Zusammenhang mit der IFN γ -ähnlichen Antwort von IE1. Für die Infektion mit hCMV sind, neben humanen Fibroblasten, Endothelzellen die physiologisch relevantere Zellpopulation, da sie direkten Kontakt zum Blutkompartiment besitzen und

gezielten Einfluss auf die Migration von Leukozyten haben können. Mittels lentiviralem Gentransfer sollen induzierbar IE1-exprimierende Endothelzelllinien generiert werden und im Hinblick auf eine verstärkte Expression von ISGs (im speziellen CXCR3-Liganden) überprüft werden. Im Fall einer verstärkten Aktivierung dieser Gene wäre der nächste Schritt die Etablierung eines Adhäsionstests und die Untersuchung einer möglichen Interaktion von IE1-exprimierenden Endothelzellen und CXCR3-positiven Immunzellen. Dies soll zu einem besseren Verständnis der frühen Prozesse nach hCMV-Infektion beitragen, welche mögliche Angriffspunkte für neue antivirale Therapiestrategien aufzeigen könnten.

B. Material und Methoden

B.1. Material

B.1.1. Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Western Blot- bzw. Immunfluoreszenz-Verfahren und für Neutralisationstests eingesetzt.

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung/Konzentration	Nr.*
anti-CXCR3	BD Pharmingen; 557183	1:500 (IF); 1:1000 (WB)	210
anti-GAPDH	Abcam; ab9485	1:2000 (WB)	77
anti-GFP	Abcam; ab290	1:2500 (IF)	124
anti-IE1 (1B12)	Zhu et al., 1995	1:2 (IF)	29
anti-IFN β	R&D Systems; AF814	2 μ g/ml (NT)	188
anti-IFN γ	R&D Systems; AF-285-NA	1 μ g/ml (NT)	189
IgG (Ziege)	R&D Systems; AB-108-C	2 μ g/ml (NT)	191
IgG1, κ (Maus)	BD Pharmingen; 555746	1/500 (IF)	211

IF = Immunfluoreszenzmikroskopie, IgG = Immunglobulin G, NT = Neutralisationstest, WB = Western Blot,

*Nummer in der Antikörper-Datenbank der Arbeitsgruppe

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung	Nr.*
anti-Kaninchen-IgG	Millipore, AP156P	1 zu 10 000 (WB)	203
anti-Maus-IgG	Molecular Probes, A11001	1 zu 1000 (IF)	204
anti-Maus-IgG	Molecular Probes, A11032	1 zu 1000 (IF)	205
anti-Kaninchen-IgG	Molecular Probes, A11008	1 zu 1000 (IF)	206

HRP = horseradish peroxidase, IF = Immunfluoreszenzmikroskopie, IgG = Immunglobulin G, WB = Western Blot,

*Nummer in der Antikörper-Datenbank der Arbeitsgruppe

B.1.2. Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion und Biomers in high performance liquid chromatography-gereinigter Form bezogen und in die (reverse Transkriptase) quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) (s. B.2.1.9, S. 25) eingesetzt.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Zielsequenz	Orientierung	Sequenz in 5'->3'-Richtung	PCR-Effizienz	Zeit (s) [#]	Temp. (°C) ⁺	Nr.*
CXCL9	fw	GAGTCCAAGGAACCCCACTAGT	1,87	8	66-56	531
	rv	GGTGGATAGTCCCTTGGTTGGT				532
CXCL10	fw	TCCACGTGTTGAGATCATTGC	1,95	8	66-56	533
	rv	TCTTGATGCCCTCGATTCTG				534
CXCL11	fw	CAAGGCTTCCCCATGTTCA	1,88	8	66-56	535
	rv	CCCAGGGCGTATGCAAAGA				536
GAG	fw	GGAGCTAGAACGATTGCGAGTTA	1,90	8	66-56	740
	rv	GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTGTC				739
GBP4	fw	GCTCCAAGCAGTCCTTCAC	1,95	12	66-56	537
	rv	GTGGTGGCTCATGCCTAAAT				538
IE1	fw	CCTAGTGTGGATGACCTA	1,88	8	58	292
	rv	GTGACACCCAGAGAACATCAG				293
IFNGR	fw	TCCAGCTGTCTGGAATCACA	1,90	8	66-56	680
	rv	GGAGGTGGGGCTTTATTA				681
TUBB	fw	TATCAGCAGTACCAGGATGC	1,92	8	66-56	363
	rv	TGAGAAGCCTGAGGTGATG				364

fw = forward, rv = reverse, [#]Polymerisationszeit, ⁺Hybridisierungstemperatur, *Nummer in der Oligonukleotid-Datenbank der Arbeitsgruppe

B.1.3. siRNAs

Die folgenden siRNAs wurden für den knockdown von IFN-Rezeptoren (s. C.2.10, S. 65) verwendet.

Tabelle 4: Verwendete siRNAs

Zielsequenz	Sequenz des antisense-Stranges in 5'->3'-Richtung	Quelle	Nr. *
IFNAR1	UUUUGGAGCACCGAUUAUAGdAdT	Ambion; s783	167
IFNAR1	UCUGAGCUUUGCGAAAUGGdTdG	Ambion; s784	168
IFNGR1	UACGAGUUUAAGCGAUGCdTdG	Ambion; s7193	169
IFNGR1	UCAAUUGUAACAUUAGUUGdTdT	Ambion; s7194	170
-	siKontrolle#1 (Sequenz unbekannt)	Ambion; 4390843	149

*Nummer in der siRNA-Datenbank der Arbeitsgruppe

B.1.4. Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden zur Herstellung rekombinanter Lentiviren verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Größe	Wichtige Genprodukte	Quelle	Nr.*
pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR	9188 bp	EGFPnlsTetR, G418-Resistenz	Everett et al., 2009	689
pMD2.G	5824 bp	VSV Hüllprotein G	D. Trono, Addgene	691
psPAX2	10703 bp	HIV-1 Gag-Pol, Tat, Rev	D. Trono, Addgene	693
pLKO.1.puro	7032 bp	Puromycin-Resistenz	R. Weinberg, Addgene	694
pLKO.DCMV.TetO.cIE1	8931 bp	TN IE1, Puromycin-Resistenz	Knoblauch et al. 2011	696

EGFP = enhanced green fluorescent protein, Gag = gruppenspezifisches Antigen, HIV-1 = humanes Immundefizienz-Virus Typ 1, IE1 = immediate-early 1-Protein, nls = nuclear localization signal, Pol = Polymerase,

Rev = regulator of expression of virion proteins, Tat = trans-activator of transcription, TetO = Tetracyclin-Operator, TetR = Tetracyclin-Repressor, TN = hCMV-Towne-Stamm, VSV = vesikuläres Stomatitisvirus; *Nummer in der Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe

B.1.5. Zellen und Viren

B.1.5.1. Escherichia coli-Stämme

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden die Bakterienstämme GM169 (McGraw und Marinus 1980) und DH5 α (Wang et al. 1993) verwendet.

B.1.5.2. Humane Zellen

Plasmidtransfektionen wurden mit der humanen, p53-negativen Lungenkarzinomzelllinie H1299 und den humanen embryonalen Nierenepithelzellen 293T durchgeführt. Für die Charakterisierung der IE1-Antwort in verschiedenen Zelltypen wurden primäre humane Lungenfibroblasten (MRC5) und humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC = human umbilical vein endothelial cell) verwendet. Des Weiteren wurde mit induzierbar IE1-exprimierenden Zellen (TetR-IE1) gearbeitet, welche entweder auf MRC5 oder auf HUVEC basierten. Als Kontrollzellen dienten MRC5 oder HUVEC, die entweder nur das EGFPnlsTetR-Fusionsprotein oder zusätzlich eine Puromycin-Resistenz (TetR-Puro) exprimieren. Für die Adhäsionsexperimente wurden CD34+ myeloische Leukämiezellen (KG1) und mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC = peripheral blood mononuclear cell) verwendet. Die PBMCs wurden hierzu frisch aus peripherem Spenderblut isoliert (s. B.2.3.2, S. 32). Außerdem wurde die humane Brustkrebszelllinie MCF7 als Positivkontrolle für den CXCR3-Nachweis (s.C.3.6, S. 77) eingesetzt.

Tabelle 6: Verwendete humane Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle	Nr.*
293T	embryonale Nierenepithelzellen	GenHunter, Q401	205
H1299	p53-negative Lungenkarzinomzellen	ATCC, CRL-5803	84
HUVEC	Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	M. Hoenicka, Regensburg	204
TetR-HUVEC	Endothelzellen mit EGFPnlsTetR-Expression	diese Arbeit	217
TetR-IE1-HUVEC	Endothelzellen mit EGFPnlsTetR- und IE1-Expression	diese Arbeit	218
TetR-Puro-HUVEC	Endothelzellen mit EGFPnlsTetR-Expression und Puromycin-Resistenz	diese Arbeit	-
KG1	CD34+ myeloische Leukämiezellen	J. Sinclair, Cambridge	12
MCF7	Brustkrebszellen	T. Shenk, Princeton	50
MRC5	primäre Lungenfibroblasten	ATCC, CCL-171	52
TetR-MRC5	Lungenfibroblasten mit EGFPnlsTetR-Expression	diese Arbeit	168
TetR-IE1-MRC5	Lungenfibroblasten mit EGFPnlsTetR- und IE1-Expression	diese Arbeit	167
TetR-Puro-MRC5	Lungenfibroblasten mit EGFPnlsTetR-Expression und Puromycin-Resistenz	diese Arbeit	-
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen verschiedener Spender	diese Arbeit	-

*Nummer in der Zelllinien-Datenbank der Arbeitsgruppe

B.1.5.3. Viren

Der laboradaptierte hCMV-Stamm „Towne“ (TN) stammt ursprünglich aus dem Urin eines infizierten Kindes (American Type Culture Collection; ATCC-Nr VR-977), ist durch vielfache Zellkulturpassagen besonders an humane Fibroblasten angepasst und gilt allgemein als apathogen (MacCormac und Grundy 1999; Prichard et al. 2001; Murphy et al. 2003; Wang et al. 2004).

Zum Vergleich einer hCMV-Infektion in Endothel- und Fibroblastenzellen (s. C.3.3, S. 72) wurde der hCMV-FIX (fusion inducing factor x) -Stamm (FX) verwendet. Dieser wurde aus dem „klinischen Isolat“ VR1814 einer Schwangeren mit primärer hCMV-Infektion gewonnen und gilt aufgrund weniger Zellkulturpassagen (Revello et al. 1992; Hahn et al. 2002) als hoch pathogen. So kann er neben Fibroblasten potentiell auch andere Zelltypen (z.B. humane Endothelzellen) infizieren, was eher einer in vivo Infektion des Menschen entspricht. Eine tragende Rolle für den Viruseintritt in Endothelzellen spielt hierbei der „pentamere Komplex“, welcher aktuelles Ziel von Impfstoffentwicklungen ist (Revello und Gerna 2010; Freed et al. 2013).

B.1.6. Zytokine

Die folgenden Zytokine wurden zur Untersuchung der IFN-Antwort in IE1-exprimierenden Fibroblasten (s. C.2.6, S. 59 bis C.2.9, S. 64), zur Stimulation von PBMCs (s. B.2.3.2, S. 32) oder als Positivkontrolle in Adhäsionsexperimenten (s. C.3.7, S. 78; C.3.8, S.80) eingesetzt.

Tabelle 7: Verwendete Zytokine

Bezeichnung	Quelle	Konzentration
IFN β	Biomol; 86421	10 ng/ml
IFN γ	R&D Systems; 285-IF	10 ng/ml
IL2	Miltenyi; 130-093-901	100 ng/ml
TNF α	R&D-Systems; 210-TA-050	10 ng/ml

B.2. Methoden

B.2.1. Nukleinsäure-Methoden

B.2.1.1. Kultivierung und Lagerung von E.coli-Kulturen

Zur Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur für Plasmidpräparationen (s. B.2.1.2, S. 21) wurde ein Teil einer Glycerinkultur oder eine Einzelkolonie in LB-Medium (10 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l Bacto-Trypton; 10 g/l NaCl in H₂O_{bid}) gegeben und dieses zur Selektion mit dem Antibiotikum Ampicillin (50 µg/ml; AppliChem; A08390100) versetzt. Die Kultur wurde über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert (ThermoForma Orbital Shaker; 220 rpm).

B.2.1.2. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmidisolierung wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits (EndoFree Plasmid Maxi Kit; Qiagen; 12362) durchgeführt. Die Verwendung erfolgte gemäß den Herstellerangaben bis auf folgende Modifikationen. Nach der Zugabe des P3-Neutralisationspuffers wurde die Suspension für 20 min bei 10 000 rpm (SLA3000-Rotor; Sorvall) und 4°C zentrifugiert. Der QN-Elutionspuffer wurde auf 65°C vorgewärmt, bevor er verwendet wurde. Bei dem verwendeten Isopropanol wurde darauf geachtet, dass es Pyrogen-frei ist. Die Zentrifugation im Anschluss wurde für 60 min bei 2558 g und 4°C (Labofuge 400; Heraeus) durchgeführt. Vor dem Lufttrocknen wurde noch einmal kurz (1 min, 2558 g, 4°C) zentrifugiert und der letzte Tropfen Ethanol mit einer P200 Gilson-Pipette abgenommen. Im Anschluss wurden die isolierten Plasmide in der Sterilbank getrocknet; bevor sie in Endotoxin-freiem TE-Puffer gelöst wurden.

B.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsmessung von Plasmidlösungen wurde mit einem Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000; PeqLab) durchgeführt. Es wurde ein Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich von 230 bis 300 nm aufgenommen, wobei der Wert bei 258 nm zur Konzentrationsbestimmung verwendet wurde. Dabei entspricht 1 OD₂₅₈ einer Konzentration von etwa 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Lösung. Der Quotient der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm gibt Auskunft über die Reinheit der DNA-Präparation. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, da ein Absorptionsverhältnis kleiner 1,8 das Vorhandensein von Proteinverunreinigungen anzeigt.

B.2.1.4. Restriktionsanalyse

Jeweils 500 ng des zu untersuchenden Plasmids wurde mit jeweils zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen (Bgl II, R0144 S; EcoRI HF, R3101 S; Hinc II, R0103 S; Nco I HF, R3193 S; Spe I, R0133 S; Xho I, R0146 S) der Firma New England Biolabs Inc. entsprechend der Herstellerangaben inkubiert. Eine Auf trennung der entstandenen Fragmente erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

B.2.1.5. Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der Fragmentgrößen wurde die mit Restriktionsenzymen gespaltenen Plasmide (s. B.2.1.4, S. 22) in 1%igen [w/v] Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurde eine entsprechende Menge Agarose (LE Agarose; Biozym; 84 0004) in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Um die DNA anzufärben wurde die Lösung mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma; 46047) versetzt. Die noch flüssige Agarosegellösung wurde in eine vorbereitete Gelapparatur

(Hoefer HE 33, Mini horizontal submarine unit; Amersham Biosciences) gegossen und bei Raumtemperatur (RT) fest. Die DNA-Proben wurden mit einem fünfteil Volumen 6x DNA-Auftragspuffer (0,25% [w/v] Orange G; 40% [w/v] Saccharose; gelöst in 6x TAE-Puffer) versetzt und je 20 µl neben 500 ng DNA-Längenstandard (1 kb DNA Ladder; New England Biolabs; N3232S) auf das Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für etwa 1 h bei 120 V. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Durchlichtschirm sichtbar gemacht und das Gel zur Dokumentation der Ergebnisse fotografiert (Gel Doc 2000 Gel Documentation System; Bio-Rad).

B.2.1.6. Gesamt-RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus den Zellkulturen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen; 74104) isoliert, wobei das Protokoll „Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology“ mit einigen Modifikationen angewendet wurde. Die veränderten Schritte sind nachfolgend beschrieben. Die Zellen wurden in 350 µl RLT-Puffer mit 1% [v/v] β-Mercaptoethanol durch 20-maliges Auf- und Abpipettieren lysiert. Die 700 µl des Probe-Ethanol-Gemisches wurden zweimal durch das RNeasy-Säulchen zentrifugiert. Außerdem wurde der optionale DNase I-Verdau durchgeführt (Qiagen; 79254). Die Elution der RNA erfolgte entweder mit 30 µl oder 50 µl des mitgelieferten RNase-freien Wassers. Des Weiteren wurden die Proben vor der Zentrifugation 5 min bei RT inkubiert. Um die Ausbeute zu maximieren, wurde der Elutionsschritt noch einmal wiederholt.

B.2.1.7. Gesamt-DNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-DNA wurden die Zellen in 6-wells nach Absaugen des Kulturmediums mit 3 ml phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 10 mM Na₂HPO₄; pH 7,4) gewaschen. Im Anschluss wurde der Zellrasen

mit 200 µl Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% [w/v] Trypsin; 0,02% [w/v] EDTA; PAN Biotech; P10-023500) benetzt und nach 5 min Inkubation bei 37°C vom Plattenboden abgeklopft. Die Zellsuspension wurde mit 500 µl eiskaltem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM mit L-Glutamin; D-Glucose (4,5 mg/ml) und Natriumpyruvat; Gibco; 41966-029) mit 10% [v/v] fötalem Kälberserum (FKS) versetzt. Durch 10-maliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und anschließend in ein 2 ml-Röhrchen überführt. Die wells wurden noch zweimal mit je 500 µl eiskaltem Medium gewaschen, um die Zellen quantitativ zu ernten. Nach der Sedimentation der Zellen (5 min; 1000 g; 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml FastChIP-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% [v/v] Igepal-CA630, 1,0% [v/v] Triton X-100) resuspendiert. Diesem wurden vor der Verwendung 0,5 mM DTT frisch zugesetzt. Die Zelllysate wurden gemischt (Scientific Industries VortexGenie2; 10 s; Stufe 5,5), zentrifugiert (1 min; 12 000 g; 4°C) und der Überstand entfernt. Die sedimentierte Chromatinfraktion wurde einmal mit 1 ml FastChIP-Puffer + DTT gewaschen, der Überstand anschließend mit einer P200 Gilson-Pipette vollständig entfernt und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die DNA-Isolierung mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen; 69506) nach dem Protokoll „Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocoll)“ mit einigen Änderungen, welche im Folgenden beschrieben werden. Um den Proteinase K-Verdau zu verlängern, erfolgte die Inkubation bei 56°C nach Zugabe des AL-Puffers für 30 min. Die Elution wurde mit 100 µl AE-Puffer durchgeführt, wobei die Inkubationszeit auf 5 min bei RT verlängert wurde. Dieser Schritt wurde nach Zentrifugation noch einmal wiederholt, um die DNA-Ausbeuten zu steigern.

B.2.1.8. Reverse Transkription

Um mRNA-Mengen mittels qPCR quantitativ bestimmen zu können, muss die isolierte RNA (s. B.2.1.6, S. 23) erst in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (LifeTechnologies; 18080-051) mit Oligo(dT) als Primer verwendet. Es wurden definierte Mengen an RNA in jede Reaktion eingesetzt,

um zu erreichen, dass die Proben nach der reversen Transkription gleiche Mengen an cDNA enthielten.

B.2.1.9. qPCR

Die quantitative Bestimmung verschiedener (c)DNA-Proben erfolgte mittels qPCR. Die Messung basiert auf der Anlagerung des Farbstoffes SYBR Green I an die kleine Grube doppelsträngiger DNA, was mit einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz ($\lambda_{\text{Emission}} = 530 \text{ nm}$) im Vergleich zu freiem oder an einzelsträngige DNA gebundenem SYBR Green I einhergeht. So kann mittels Fluoreszenzmessung am Ende der einzelnen PCR-Zyklen die Zunahme des Produkts ermittelt werden. Die Identität des Produktes wird durch Überprüfung der Schmelztemperatur kontrolliert. Die PCR-Zyklus-Anzahl zu Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase wird crossing point value (cp-Wert) genannt. E bezeichnet die Primer-Effizienz und damit den Amplifikationsfaktor für jeden Zyklus. Somit beträgt E im Idealfall 2,00, was einer Verdopplung der Amplikonmenge entspricht. Dieser Wert wird in der Praxis jedoch nur selten erreicht; E bewegt sich in der Regel zwischen 1,90 und 2,00.

Aufgrund der exponentiellen Amplifikation gilt:

$$(1) N_n = N_0 \times E^n$$

Mit N_n = Menge an Amplikon im Zyklus n und N_0 = Menge an Ziel-DNA im Zyklus 0

Damit gilt für den Zyklus cp als Spezialfall von (1):

$$(2) N_0 = N_{cp} \times E^{-cp}$$

Das heißt, die Menge an Amplikon in der Probe ist proportional zu E^{-cp} . Die qPCR wurde mit Hilfe des LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I-Kits (Roche; 4957164702) und einem LightCycler-Gerät (Roche LightCycler 1.5 Instrument) nach Herstellerangaben mit folgendem Programm durchgeführt, wobei jede Kapillare (Roche; 04929292001) 9 µl H₂O, 4 µl MasterMix, je 1 µl der beiden Primer (10 µM) und 5 µl DNA-Probe enthielt:

Tabelle 8: LightCycler-Standardprotokoll

1x	10 min	95°C
	10 s	95°C
40x	10 s	X°C
	Y s	72°C
1x	Schmelzkurve von 65-95 °C	

Die X- und Y-Werte können der Tabelle 3 entnommen werden

B.2.2. Proteinbiochemische Methoden

B.2.2.1. Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus adhärenten humanen Zellen wurde das Kulturgefäß auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 3 ml (6-well) oder 10 ml (10 cm-Schale) eiskaltem PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers (Fisher Scientific, 3468136) wurden die Zellen in 500 µl (6-well) bzw. 2,5 ml (10 cm-Schale) serumfreiem, eiskaltem Medium abgekratzt, in ein vorgekühltes Röhrchen überführt, und jedes Kulturgefäß noch zweimal mit 500 µl (6-well) bzw. 2,5 ml (10 cm-Schale) Medium nachgespült. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min; 1000 g; 4°C) sedimentiert. Nach dem Abgießen des Überstands und erneuter kurzer Zentrifugation (30 s; 1000 g; 4°C) wurde der restliche Überstand mit einer Pipette entfernt, das Pellet zügig in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die PBMCs wurden unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und eingefroren. Nach dem Auftauen wurde jedes Pellet in 30 µl

(6-well) bzw. 50 µl (10 cm-Schale; PBMCs) MIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM NaCl; 0,1% [w/v] SDS; 1% [v/v] Igepal CA-630; 0,5% [w/v] Natriumdeoxycholat) mit 1% [v/v] Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem; 539134), je 2% [v/v] Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2 (Sigma; P2850 und P5726) und 0,1% [v/v] Benzonase Nuklease (Novagen; 70746) durch 20-maliges Auf- und Abpipettieren und kurzes Schütteln (Scientific Industries VortexGenie2; 30 s; Stufe 8) resuspendiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden sedimentiert (10 min; 16 000 g; 4°C) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Um später gleiche Mengen an Protein analysieren zu können, erfolgte eine Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford (Bradford 1976). Jede Probe wurde mit einem Volumen 2x Protein-Ladepuffer (60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% [w/v] SDS; 10% [v/v] Glycerin; 0,001% [w/v] Bromphenolblau; 1,5% [v/v] β-Mercaptoethanol) versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und kurz zentrifugiert. Die Proteine in den Gesamtzellextrakten wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren analysiert.

B.2.2.2. SDS-PAGE und Western Blot-Analyse

Die elektrophoretische Auftrennung der in den Gesamtzellextrakten (s. B.2.2.1, S. 26) enthaltenen Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (Laemmli 1970) mit 10%igem Trenngel (30% [v/v] Acrylamid-Lösung (30% [w/v] Acrylamid-/Bisacrylamidlösung; Mix 37,5:1; AppliChem; A1672.1000); 375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% [w/v] Ammoniumperoxodisulfat; 2,64 mM TEMED) und 5%igem Sammelgel (17% [v/v] Acrylamid-Lösung; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% [w/v] SDS; 0,1% [w/v] Ammoniumperoxodisulfat; 6,6 mM TEMED). Der Aufbau und das Gießen der Gele wurde nach Herstellerangaben (Mini-PROTEAN 3 Cell; Bio-Rad; 165-3301) durchgeführt. Von jeder Probe wurden zwischen 10 µl und 15 µl geladen und 10 µl eines Protein-Größenstandards (Prestained Protein Marker, Broad Range; New England Biolabs; P7708) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 25 mA in Tris-Glycin-Puffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 1% [w/v] SDS) bis die Lauffront am unteren Gelrand angelangt war. Die Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll;

Optitran BA-S83) wurde ebenso wie das Trengel für 5 min in Towbin-Puffer (13 mM Tris; 100 mM Glycin; 20% [v/v] Methanol) äquilibriert, bevor der Transfer im Submers-Blot-Verfahren (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell; Bio-Rad; 170-3930) für 1 h bei 300 mA nach Herstellerangaben erfolgte. Zur Kontrolle des Transfers wurden die auf die Membran übertragenen Proteine mit Ponceau S-Lösung (1% [w/v] Ponceau S; 5% [v/v] Essigsäure) reversibel angefärbt und zuerst der Hintergrund mit entionisiertem Wasser, dann die Proteinbanden mit PBS_{Tween0,1} (PBS, 0,1% [v/v] Tween 20) wieder entfärbt. Im Anschluss wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran für 2 h bei RT in PBS mit 5% [w/v] Magermilchpulver blockiert, die Nitrozellulose mit PBS_{Tween0,1} gewaschen und über Nacht bei 4°C mit einer Verdünnung des Primärantikörpers (s. Tabelle 1, S. 15) in PBS inkubiert. Nach der Bindung des Primärantikörpers wurde die Membran dreimal für 5 min in PBS_{Tween0,1} gewaschen, für 1 h mit einer Verdünnung des Sekundärantikörpers (s. Tabelle 2, S. 15) in PBS mit 3% [w/v] Magermilchpulver inkubiert, erneut dreimal für 5 min in PBS_{Tween0,1} und einmal kurz in PBS ohne Tween 20 gewaschen. Die Detektion des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte nach Herstellerangaben mit einem Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal West Pico; Pierce; 34080 bzw. SuperSignal West Femto; Pierce; 34096). Der Nachweis des Signals erfolgte durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilms (CL-Xposure Film 18 x 24 cm, Thermo Scientific, 34089; Entwickler: GBX developer/replenisher, Sigma, P7042; Fixierer: GBX fixer/replenisher, Sigma, P7167).

B.2.2.3. (Immun-)Fluoreszenzmikroskopie

Für den Nachweis zellulärer oder viralen Proteine mittels IF wurden adhärente Zellen in 6-well-Platten auf sterile Deckgläser (Roth; H874.2) ausgesät. Nach Doxycyclin-Behandlung, Lentivirus-Transduktion oder Infektion mit einem klinischen hCMV-Isolat erfolgte die Fixierung der Zellen zum gewünschten Zeitpunkt nach einem von zwei Protokollen: Paraformaldehyd (PFA)-Fixierung oder Methanol-Fixierung. Bei beiden Fixierungsverfahren wurde das Deckglas zuerst in PBS_{Tween0,05} (PBS mit 0,05% [v/v] Tween 20) gewaschen und anschließend mit einer Pinzette in ein frisches, mit PBS_{Tween0,05} gefülltes 6-

well überführt. Für die PFA-Fixierung wurde die Probe 15 min bei RT in PBS mit 2% [w/v] PFA inkubiert. Anschließend wurde das Präparat zunächst einmal für 5 min in PBS mit 125 mM Glycin und anschließend dreimal für 5 min in PBS_{Tween0,05} gewaschen. Im Anschluss wurden die fixierten Zellen durch Inkubation für 15 min bei RT in PBS mit 0,1% [v/v] Triton X-100 permeabilisiert und erneut dreimal für 5 min mit PBS_{Tween0,05} gewaschen. Für die Methanol-Fixierung wurde die Probe für 15 min bei -20°C mit vorgekühltem Methanol inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit PBS_{Tween0,05} gewaschen. Eine Variante dieser Methode war die Methanolfixierung der nicht adhärenten Blutzellen. Diese wurden zuerst abzentifugiert (10 min, 325 g, 4°C), daraufhin in vorgekühltem Methanol resuspendiert, für 10 min bei -20°C inkubiert und anschließend auf ein Deckglas getropft, welches in der Sterilbank bei RT getrocknet wurde. Die Methanol-fixierten Präparate wurden bei -20°C gelagert oder sofort in die Immunfärbung eingesetzt. Um eine unspezifische Reaktion der Primärantikörper zu vermeiden, erfolgte eine einstündige Blockierung der Präparate in PBS_{Tween0,05} mit 2% [w/v] bovinem Serumalbumin (Albumin Fraktion V; AppliChem; A1391), danach zwei kurze Waschgänge mit PBS_{Tween0,05} und schließlich die Inkubation mit einer Verdünnung des Primärantikörpermischung (s. Tabelle 1, S. 15) in Blockierungslösung. Hierbei wurde das Deckglas mit der Zellseite nach oben auf ein Stück Parafilm gelegt, mit 100 µl Antikörperlösung bedeckt und in einer Dose mit feuchtem Whatman-Papier inkubiert. Es erfolgten drei weitere Waschschritte für 5 min in PBS_{Tween0,05}, bevor das Deckglas wieder auf Parafilm gelegt und in der feuchten Kammer lichtgeschützt für 1 h mit 100 µl des Sekundärantikörpermischung (s. Tabelle 2, S. 15) in Blockierungslösung inkubiert wurde. Die Sekundärantikörperverdünnung enthielt außerdem 0,33 µg/ml des DNA-Farbstoffes 4,6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI; Roche; 10236276001). Nach weiteren Waschschritten (dreimal für 5 min in PBS_{Tween0,05}, einmal für 5 min in PBS) wurde das Deckglas mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei auf 20 µl ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes; P36930), welche sich auf der Oberseite eines gereinigten Objektträgers befanden, gelegt. Die Präparate wurden über Nacht bei RT getrocknet und mit Hilfe des institutseigenen Fluoreszenzmikroskops (DMRX; Leica) mit digitalem Bildverarbeitungssystem (Image Pro 2.6) analysiert.

B.2.3. Zellkulturverfahren

B.2.3.1. Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der meisten adhärenten Zelltypen (293T, H1299, MCF7, MRC5) erfolgte in Vollmedium bestehend aus DMEM (s. B.2.1.7, S. 23) mit 10% [v/v] FKS (Gibco; 10270-106), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep; PAN Biotech GmbH; P06-07100). Die Endothelzellen (HUVEC) wurden in MWES (PAA Laboratories GmbH; E15-033) mit 10% [v/v] FKS, Pen/Strep und 2% [v/v] Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix (PromoCell; C-39215) gezüchtet. Suspensionszellen (KG1, PBMC) wurden in RPMI-Medium (RPMI 1640 mit L-Glutamin, 2,0 g/l NaHCO₃; PAN-Biotech; P04-16500), mit 10% [v/v] FKS und Pen/Strep kultiviert. Die Inkubation aller Zellen erfolgte in einem wasserdampfgesättigten HERAcell 240 Inkubator (Heraeus) bei 37°C Innentemperatur und 5% [v/v] CO₂-Gehalt. Standard-Kulturvolumina waren 25 ml in 15 cm-Schalen (BD Falcon; 35 3025), 10 ml in 10 cm-Schalen (BD Falcon; 35 3003), 2 ml in 6-wells (BD Falcon; 35 3046), 1 ml in 12-wells (BD Falcon; 35 3043), 100 µl in 96-wells (BD Falcon; 35 3072 bzw. Greiner bio-one; 65 5090) und 15 ml in 250 ml-Zellkulturflaschen (BD Falcon; 35 3136). Die Bestimmung der Zellzahl wurde entweder mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer oder eines automatischen Zellzählers (Scepter Handheld Automated Cell Counter; Millipore; PHCC20060) durchgeführt.

Zur Expansion wurden die adhärenten Zellen nach Erreichen der Konfluenz unter Verwendung einer Trypsin/EDTA-Lösung folgendermaßen subkultiviert:

- 293T im Verhältnis 1:10
- H1299 im Verhältnis 1:10
- HUVEC im Verhältnis 1:3 bis 1:5
- MCF7 im Verhältnis 1:10
- MRC5 im Verhältnis 1:3

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (s. B.2.1.7, S. 23) 3 min bei 37°C inkubiert, was dazu führt, dass sich die Zellen vom Schalenboden und voneinander lösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Vollmedium abgestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und die Zellsuspension wurde unter Schwenken auf neue Kulturschalen verteilt.

Die immortalisierten KG1-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 passagiert, sobald sie eine Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht hatten. Hierfür wurde 3,3 ml der Zellen in 6,7 ml frisches RPMI-Kulturmedium überführt. Bei den PBMC-Zellen wurde nur bei längerer Kultivierung das Kulturmedium alle zwei Tage bis täglich gewechselt oder sie wurden gleich nach der Isolierung verwendet.

Tabelle 9: Eingesetzte Volumina bei der Subkultivierung von Zellen

Sub-kultivierung	Schalen-durchmesser	PBS (ml)	Trypsin/EDTA (ml)	Medium* (ml)	Zellsuspension (ml)	Medium# (ml)
1:3	10 cm	10	1,5	8,5	3	7
	15 cm	25	4	9	4	21
1:5	10 cm	10	1,5	14,5	3	7
	15 cm	25	4	17	4	21
1:10	10 cm	10	1,5	18,5	2	8
	15 cm	25	4	36	4	21
1:20	10 cm	10	1,5	8,5	0,5	9,5
	15 cm	25	4	36	2	23

*Medium zum Vereinzen der Zellen, # in den Kulturschalen vorgelegtes Medium

Zur Selektion der TetR-Zellen wurde G418 (200 µg/ml; Calbiochem; 345810), für TetR-IE1- bzw. TetR-Puro-Zellen G418 und Puromycin (1 µg/ml; Sigma; P8833) verwendet. Zur Induktion der IE1-Expression wurde Doxycyclin (Clontech Laboratories; 631311) benutzt. Bei einer Induktion über 72 h wurden alle 24 h je 0,33 µg/ml Doxycyclin in das Zellkulturmedium gegeben. Erfolgte eine kürzere Induktion wurden die Doxycyclingaben angepasst (48 h: zweimalige Gabe von 0,5 µg/ml; 24 h und kürzer: einmalige Gabe von 1 µg/ml). Die IE1-Expression in TetR-IE1-HUVEC wurde mit 1 µg/ml Doxycyclin oder mit 0,4 µg/ml

Doxycyclin induziert, um in Langzeitexperimenten toxische Effekte zu vermeiden. Für die Adhäsionsexperimente, die genauere Charakterisierung der IE1-Antwort und zur Wachstumsstimulation wurden die Zellen mit IFN β , IFN γ , IL2, oder TNF α (s. Tabelle 7, S. 20) behandelt.

B.2.3.2. Gewinnung von PBMCs und IL2-Stimulation

Um periphere mononukleäre Blutzellen zu isolieren, wurde den Spendern jeweils 60 ml venöses Blut abgenommen, welches zur Antikoagulation mit Heparin oder Citrat versetzt wurde. In einer Zellkulturflasche (BD Falcon; 353136) wurde das antikoagulierte Blut gesammelt, mit 60 ml PBS verdünnt und die Blutabnahmeröhrchen dabei mit PBS gespült, um eine vollständige Überführung des Blutes zu gewährleisten. Im Folgenden wurden je 30 ml der verdünnten Blutprobe in Leukosep-Röhrchen (Greiner bio-one; 227288) pipettiert, diese zentrifugiert (15 min, 800 g (ohne Bremse), RT) und der Überstand bis 1 cm oberhalb der PBMC-Schicht mit einer sterilen 10 ml-Plastikpipette (Greiner bio-one; 607 180) entfernt. Die Schicht mit PBMCs wurde in ein neues 50 ml-Röhrchen gegossen und das Leukosep-Röhrchen mit PBS nachgespült. Die Zellsuspension wurde mit PBS auf 45 ml aufgefüllt, die PBMCs sedimentiert (10 min; 300 g; RT), der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die isolierten PBMCs werden in einem Röhrchen gesammelt, das Volumen mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und die Zellen mit dem Scepter-Zellzähler (Millipore, PHCC20060; 60 μ m-Spitze) gezählt. Anschließend erfolgte eine erneute Sedimentation (10 min; 300 g; RT) und nach der Entfernung des Überstands wurden die Zellen entweder mit Einfriermedium (FKS, 10% [v/v] Dimethylsulfoxid (Sigma; D2438)) auf eine finale Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml gebracht und eingefroren, oder zur weiteren Kultivierung in RPMI-Medium (s. B.2.3.1, S. 30) resuspendiert ($1,3 \times 10^4$ /ml).

Bevor die PBMCs in Adhäsionsversuchen (s. C.3.7, S.78; C.3.8, S. 80) zum Einsatz kamen, wurde ein Teil der Zellen mit IL2 stimuliert, um die Proliferation anzuregen und sie zu aktivieren. Hierfür wurde dem RPMI-Kulturmedium IL2 (s. Tabelle 7, S. 20) hinzugefügt.

Dies erfolgte direkt nach dem Aussäen und durch Medienwechsel zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 5, 7, 8, 9, 10, 11 nach dem Auftauen). Diese stimulierten PBMCs wurden schließlich am Tag 12 in den Adhäsionstest eingesetzt.

B.2.3.3. Testung von Zellkulturen auf Mykoplasmen

Für die Untersuchung von Zellkulturen auf eine Verunreinigung mit Mykoplasmen wurde ein Mykoplasmatest Kit (Promocell; PK-CA20-700-20) gemäß Herstellerprotokoll angewendet. Für die PCR wurde der iCycler Thermal Cycler der Firma Bio-Rad verwendet. Die Auf trennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2%igem [w/v] Agarosegel (s. B.2.1.5, S. 22). Je 20 µl der Probe bzw. Positivkontrolle und 10 µl eines DNA-Längenstandards (100 bp DNA Ladder; New England Biolabs; N3232S) wurden auf das Agarosegel geladen. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 45 min bei 120 V.

B.2.3.4. Kollagenbeschichtung von Kulturgefäßen

Essigsäure (17,652 N; Sigma Aldrich; 33206) wurde in sterilem Wasser auf eine Konzentration von 0,02 N verdünnt und mit einem 0,22 µm Filter (Roth; P666.1) sterilfiltriert. Anschließend wurden 50 µg/ml Kollagen (Rat Tail Collagen Type I; BD Biosciences; 354236) zugesetzt und die Hälfte eines normalen Kulturvolumens dieser Lösung auf Kulturgefäße pipettiert. Es erfolgte eine dreistündige Inkubation bei RT auf dem Schüttler (Promax 2020; Heidolph Instruments; Stufe 2-3) bevor die Schalen bzw. Platten zuerst einmal mit einem Kulturvolumen PBS und anschließend zweimal mit einem Kulturvolumen Wasser gewaschen wurden. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Gefäße in der Sterilbank getrocknet und bei 4°C gelagert oder gleich verwendet.

B.2.3.5. Gewinnung von konditioniertem Medium

TetR-IE1- bzw. TetR-Puro-Fibroblasten wurden auf 15 cm-Schalen ausgesät, nach 4 Tagen erfolgte ein Medienwechsel und weitere 3 Tage später die Induktion mit Doxycyclin für 72 h. Im Anschluss wurde das Kulturmedium abgenommen, zentrifugiert (10 min; 2500 g; 4°C) und der Überstand aliquotiert bei -80°C eingefroren.

B.2.3.6. Transfektion und Transduktion humaner Zellen

B.2.3.6.1. Kalziumphosphatpräzipitation

Um DNA in eukaryontische Zellen (hier 293T) einzuschleusen wurde mit dem Verfahren der Kalziumphosphatpräzipitation gearbeitet. Dabei bilden sich Copräzipitate aus CaPO₄ und DNA, die dann durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Vorgehensweise verwendet, um rekombinante Lentiviren herzustellen. Die genetische Information zur Generierung dieser Viren befindet sich auf den verwendeten Plasmiden (s. Tabelle 5, S. 17).

Am Vortag der Transfektion wurden je $1,325 \times 10^7$ Zellen auf sechs Kollagen-beschichtete 15 cm-Schalen (s. B.2.3.4, S. 33) ausgesät. Da sich saures Medium negativ auf die Transfektionseffizienz auswirkt, erfolgte 1 h vor der Transfektion ein Mediumwechsel. Für die Transfektion wurden folgende Plasmidmengen eingesetzt und mit steriles H₂O_{dest} auf 7312,5 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 812,5 µl 2,5 M CaCl₂ zugegeben, die Proben gemischt und kurz zentrifugiert. In einem 50 ml-Gefäß (BD Falcon; 352098) wurden 8,125 ml 2x HeBS-Puffer (50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 7,05) vorgelegt. Das Plasmidgemisch wurde anschließend unter schwachem Mischen auf einem VortexGenie2 (Stufe 4-5) tropfenweise zugegeben. Im Idealfall berühren die Tropfen nicht die Gefäßwand, sondern fallen direkt in den HeBS-Puffer. Der Ansatz wurde 15 min bei RT

inkubiert. Während dieser Zeit wurde Chloroquin in das Medium der Zellen gegeben (Endkonzentration 25 µM). Es inhibiert durch Neutralisierung des lysosomalen pH-Werts DNasen, die ansonsten die Plasmid-DNA abbauen würden.

Tabelle 10: Eingesetzte Plasmidmengen

Nr.*	Bezeichnung	Eingesetzte Menge [µg]
689	pLKOneo.HCMV.EGFPnlsTetR	25
691	pMD2.G	6,25
693	psPAX2	18,75
694	pLKO.1.puro	25
696	pLKO.DHCMV.TetO.cIE1	25

*Nummer in der Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe

Danach wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das Medium der Zellen gegeben und dabei gleichmäßig über die Einschichtkultur verteilt. Die Kulturschalen wurden geschwenkt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag (~16 h später) erfolgte ein Mediumwechsel. Das frische Kulturmedium enthielt 10 mM Histondeacetylaseinhibitor (NaButyrat; Millipore; 19-137) und blieb für 8 h auf den Zellen. Im Anschluss wurde der Histondeacetylaseinhibitor durch Waschen mit 25 ml PBS entfernt und je 18 ml frisches Medium auf die 293T-Zellen gegeben. Weitere 20 h später wurde der virushaltige Überstand mit einer sterilen Plastikpipette abgenommen, zentrifugiert (10 min; 800 g; 4°C) und bei 4°C gelagert. Zur Erhöhung der Gesamtausbeute wurde auf die transfizierten Zellen erneut 18 ml frisches Medium gegeben und diese für 20 h weiter-inkubiert. Nach dem Sammeln und Zentrifugieren des zweiten Kulturüberstands wurde die gesamte Virussuspension langsam durch einen 0,45 µm Filter (VWR International, 514-0603) filtriert. Im Anschluss erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 19 500 rpm und 16°C für 2 h im SW32-Rotor (Optima L-90K Ultracentrifuge; Beckman Coulter), um die Lentiviren zu sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im letzten Tropfen für 4,5 h bei 4°C inkubiert. Um die Lentiviren wieder zu vereinzeln, wurden die Proben zunächst im Becherresonator des Branson Sonifiers beschallt (output control: 0.8; duty cycle: 80%; 10 Pulse; 4°C) und anschließend mehrmals auf- und abpipettiert. Die Virus-Stocks wurden in einem 1,5 ml Röhrchen gesammelt, kurz zentrifugiert (1 min; 800 g; 4°C)

und der Überstand in einem frischen Gefäß bei -80°C eingefroren oder gleich zur Transduktion von Zielzellen verwendet.

B.2.3.6.2. Transduktion humaner Zellen mit Lentiviren

Zur Transduktion von humanen MRC5-Zellen und HUVEC wurden in 293T-Zellen generierte rekombinante Lentiviren (s. B.2.3.6.1, S. 34) verwendet.

Frisch aufgetaute HUVEC wurden auf eine 10 cm-Schale ausgesät und 24 h später subkonfluent mit dem für EGFPnlsTetR-kodierenden Lentivirus infiziert. Hierfür wurde der Virusstock bei 37°C zügig aufgetaut, im Becherresonator des Branson Sonifiers beschallt (output control: 0.8; duty cycle: 80%; 10 Pulse; 4°C) und in Endothelzellmedium (s. B.2.3.1, S. 30) 1:20 verdünnt. Zur Verbesserung der Virusadsorption wurde die Virusverdünnung zusätzlich mit 8 µg/ml Polybrene (Sigma; H-9268) versetzt. Es wird angenommen, dass dieses Polykation durch Neutralisierung der Ladungen der Viruspartikel und der Zellmembran die Anheftung der Viren an die Zelloberfläche begünstigt und so ihre Aufnahme in die Zellen erleichtert. Die Zellen wurden für 4 h mit 5 ml Virusverdünnung bei 37°C inkubiert, danach wurde das Inokulum abgenommen, der Zellrasen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und die Zellen in frischem Medium weiterkultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen von den Schalen abgelöst (s. B.2.3.1, S. 30) und sedimentiert (8 min; 323 g; RT). Nach Entfernung des Überstands wurden die Endothelzellen in 2 ml Medium resuspendiert und jeweils 1 ml der Zellsuspension auf eine neue 10 cm-Schale ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine erneute Transduktion mit dem EGFPnlsTetR-kodierenden Lentivirus und einen Tag später die Infektion mit dem IE1- bzw. dem Puro-Lentivirus (Verdünnung jeweils 1:500) analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen. Etwa 24 h nach der letzten Lentivirusinfektion wurde dem Kulturmedium Puromycin (1 µg/ml) zugesetzt. Die Zellen wurden nun für eine Woche selektiert und konservativ subkultiviert (1:1,5 bzw. 1:2) bevor sie für weitere Experimente verwendet wurden.

Die Herstellung transgener MRC5-Zelllinien erfolgte analog bis auf folgende Änderungen. Zwischen der Transduktion mit dem EGFPnlsTetR- und den IE1-/Puro-Lentiviren erfolgte eine Selektion mit G418 für sieben Tage. Außerdem wurden die Zellen nur einmal mit dem EGFPnlsTetR-kodierenden Lentivirus infiziert.

B.2.3.6.3. siRNA-Transfektion mittels Lipofektion

Am Vortag der siRNA-Transfektion wurden ca. 2×10^5 TetR- bzw. TetR-IE1-Fibroblasten in 1 ml Vollmedium (s. B.2.3.1, S. 30) auf 12-well-Platten ausgesät. Vor der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1 ml Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco; 31985-047) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde der Transfektionsansatz in drei Schritten hergestellt. Pro well wurden 36 pmol siRNA (s. Tabelle 4, S. 17) in 100 µl Opti-MEM-Medium verdünnt (Ansatz 1) und 2 µl des siRNA-Transfektionsreagenz RNAiMAX (LifeTechnologies, 13778-150) in 98 µl Opti-MEM-Medium gegeben (Ansatz 2) und für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die beiden Ansätze zusammengeführt, für 15 min bei RT inkubiert und alle 5 min sanft gemischt. Von dem nun vollständigen Transfektionsansatz wurden je 200 µl tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben, und durch leichtes Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Die Proben wurden für 5,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend ein Medienwechsel mit Vollmedium durchgeführt.

B.2.3.7. TCID₅₀ mittels Plaque-Assay

In jede Vertiefung einer 96-well-Platte wurden 100 µl Vollmedium mit 2×10^4 MRC5-Zellen gegeben und das Kulturmedium der Zellen drei Tage später mit konditioniertem Medium (s. B.2.3.5, S. 34) von TetR-IE1- bzw. TetR-Puro-exprimierenden Fibroblasten ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurde die benötigte Menge des TN-Virusstocks (s. B.1.5.3, S. 19) bei

37°C im Wasserbad aufgetaut, die Probe zur Vereinzelung der Virionen im Becherresonator des Branson Sonifiers beschallt (output control: 8; duty cycle: 80%; 10 Pulse; 4°C) und in konditioniertem Medium logarithmisch verdünnt. Zur Infektion wurden von den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-9} je 100 µl in die 12 Vertiefungen einer Plattenreihe pipettiert (Endvolumen: 200 µl). Nach 3 Tagen erfolgte der Austausch von 100 µl des alten Kulturmediums gegen 100 µl frisches konditioniertes Medium und 8 Tage später wurden erneut 80 µl des alten Kulturmediums durch 100 µl frisches Vollmedium ersetzt. Zwei Wochen post infectionem wurden die Anzahl infizierter Zellcluster am institutseigenem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Axiovert 200) bestimmt.

B.2.3.8. Infektion von MRC5-Zellen und HUVEC mit dem hCMV-FX-Stamm

Um die Suszeptibilität von HUVEC und MRC5-Zellen für den hCMV-FX-Stamm zu vergleichen, wurden 4 Tage vor Infektion je 1×10^6 Zellen in 6-wells ausgesät, so dass die Kulturen zum Zeitpunkt der Infektion konfluent waren. Ein Aliquot des FX-Virusstocks wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit Ultraschall behandelt (Becherresonator des Branson Sonifiers; output control: 8; duty cycle: 80%; 10 Pulse; 4°C). Die Zellen wurden mit 800 µl einer 1:9-Verdünnung, einer 1:3-Verdünnung oder mit 800 µl des unverdünnten FX-Virusstock infiziert. Nach 24 h wurden 2,2 ml frisches Medium zugegeben und die infizierten Kulturen für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte ein Medienwechsel und am Folgetag die Dokumentation der infizierten Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Leica, Axiovert 200).

B.2.3.9. Adhäsionstest

Um die Adhäsion von monozytären Zellen an TetR-Puro- bzw. TetR-IE1-HUVEC zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Adhäsionstest etabliert. Hierfür wurden

$2,5 \times 10^4$ Zellen in einem Volumen von 100 µl in 96-wells (Greiner bio-one; 65 5090) ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium zur Induktion der IE1-Expression mit Doxycyclin versetzt (1 µg/ml) und die Zellen für 72 h weiterkultiviert. In den letzten 6 h dieses Zeitraums wurden die Kulturen zum Teil mit TNF α oder IFN γ (s. Tabelle 7, S. 20) behandelt. Währenddessen wurden 1×10^6 Immunzellen (KG1-Zellen oder PBMCs) sedimentiert (5 min; 323 g; RT), der Überstand abgegossen und das Pellet in 1 ml serumfreien RPMI 1640 (s. B.2.3.1, S. 30) mit 1 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes; H3570) resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min; 323 g; RT), zum Waschen in 10 ml PBS resuspendiert, wieder sedimentiert (5 min, 323 g; RT) und in dem finalen Volumen 20 ml RPMI 1640 Vollmedium resuspendiert. Je 100 µl Zellsuspension wurden zu den für 72 h induzierten TetR-IE1- bzw. TetR-Puro-Zellen gegeben und die Platten für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geschüttelt (Thermomixer Eppendorf comfort mit Adapterplatte für 96-well-Platte; 2 min; 1000 rpm) und die nicht fest haftenden Zellen mittels 1 g-Sedimentation entfernt. Hierbei wird die Platte in einem Behälter voller PBS vorsichtig untergetaucht, umgedreht und für 10 min in dieser Position belassen. Nicht oder schwach gebundene Zellen werden so mittels der auf sie wirkenden Schwerkraft aus den wells entfernt. Direkt danach wurden die Platten im Fluoreszenzreader (Victor3 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer; Emissionsfilter 460 nm; bottom reading; 100 Messungen/well; 0,1 s Abstand zwischen den Messungen) ausgewertet.

C. Ergebnisse

C.1. Optimierung der Herstellung transgener Zelllinien mit Hilfe rekombinanter Lentiviren

C.1.1. Überblick

Die Lentivirus-vermittelte Einschleusung viraler Gene in humane Zelllinien wurde in vorangegangenen Publikationen der Arbeitsgruppe (Knoblauch et al. 2011) bereits verwendet, um die Auswirkungen einzelner viraler Proteine auf menschliche Zellen zu untersuchen. Um möglichst effektiv transgene Zelllinien herzustellen, wurde das bestehende Protokoll in verschiedenen Experimenten verifiziert und optimiert. Zu Beginn wird das Grundprinzip der Herstellung transgener Zelllinien mittels lentiviralen Vektoren erläutert, auf dem weitere Untersuchungen zum IE1-Protein aufbauen (s. C.1.2, S. 41). Die zur Lentivirusherstellung verwendeten Plasmide (s. C.1.3, S. 42) wurden mittels Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit überprüft (s. C.1.4, S. 45), bevor sie eingesetzt wurden (s. C.1.4, S. 45). Die Produktion der Lentiviren wurde im Hinblick auf die produzierenden Zellen (s. C.1.6, S. 48), eine mögliche Aufkonzentrierung der Viren durch Ultrazentrifugation (s. C.1.7, S. 49) und unterschiedliche Transduktionsbedingungen (s. C.1.8, S. 51) untersucht. Somit wurde zu Beginn dieser Arbeit ein zuverlässiges und reproduzierbares Verfahren zur Lentivirusherstellung entwickelt, das die Basis für weitere Fragestellungen bildete.

C.1.2. Grundprinzip der Herstellung transgener Zelllinien

Ein methodischer Kernpunkt dieser Arbeit ist die Erzeugung von transgenen Zelllinien, mit deren Hilfe es möglich ist, den Einfluss des hCMV-IE1-Proteins auf das Transkriptom humaner Zellen genauer zu charakterisieren.

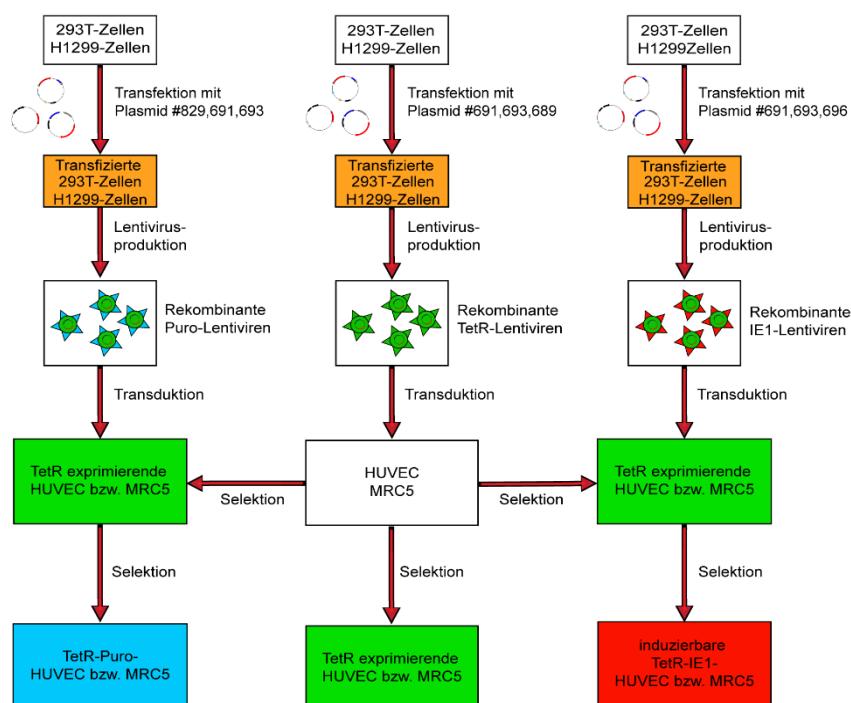


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung von TetR-, TetR-Puro- und TetR-IE1-Zellen

Zur Produktion von verschiedenen rekombinanten Lentiviren wurden 293T-Zellen (zu Beginn auch H1299-Zellen) mit entsprechenden Plasmiden transfiziert. Anschließend wurden MRC5 bzw. HUVEC zunächst mit rekombinanten Lentiviren transduziert, welche ein TetRnlEGFP-Fusionsprotein exprimieren, um TetR-Zellen zu generieren. Nach Selektion wurden diese Zellen mit rekombinanten Lentiviren transduziert, welche entweder die Expression von IE1 unter der Kontrolle eines Tetracyclin/Doxycyclin-induzierbaren Promotors oder nur eine Puromycin-Resistenz vermittelten.

Zu Beginn wurden geeignete Plasmide, welche für verschiedene funktionelle Bestandteile des späteren Lentivirus kodieren, mittels Kalziumphosphatpräzipitation (s. B.2.3.6.1, S. 34) in humane Produzentenzellen (293T- oder zu Beginn H1299-Zellen) eingeschleust (s. Abbildung 2, S. 41). Dort wurden die viralen Gene abgelesen, die einzelnen Komponenten

synthetisiert, die Lentiviren assembliert und in das Kulturmedium freigesetzt. Die so erzeugten Lentivirus-Stämme wurden aufkonzentriert und portioniert eingefroren. Durch Transduktion von MRC5 bzw. HUVEC wurde in einem nächsten Schritt die genetische Information für einen Tetracyclin-abhängigen Repressor (TetRnlsEGFP-Fusionsprotein) mittels Lentiviren in das Zellgenom eingeschleust. Durch erneute Transduktion TetRnlsEGFP-positiver MRC5 bzw. HUVEC wurde das IE1-Gen integriert. Die Transkription von IE1 wurde effektiv durch TetRnlsEGFP unterdrückt und ließ sich durch Tetracyclingabe aktivieren. Um in den nachfolgenden Experimenten zwischen den Auswirkungen der IE1-Expression und den Folgen der reinen Lentivirusinfektion unterscheiden zu können, war es außerdem notwendig Kontrollzellen zu erzeugen. Hierfür wurden TetRnlsEGFP-positive MRC5 bzw. HUVEC mit einem Lentivirus transduziert welcher außer einer Puromycinresistenz (Puro) keine weiteren funktionellen Gene integriert.

C.1.3. Rekombinante Vektoren zur Lentivirusproduktion

Um replikationsdefekte rekombinante Lentiviren für den Gentransfer in humane Zellen zu erzeugen benötigt man Plasmide, die für die strukturellen und funktionelle Bestandteile eines Lentivirus und die gewünschten Fremdsequenzen, die transferiert werden sollen, kodieren.

Als Hüllprotein für alle Lentiviren dient das Protein G des vesikulären Stomatitisvirus (VSV-G), welches auf dem pMD2.G Plasmid kodiert ist (s. Abbildung 3, S. 43). Dort findet sich auch der hCMV major IE Promotor/Enhancer (CMV-Promotor), welcher eine starke Transkription dieses Gens bewirkt (Gruh et al. 2008; Li et al. 2010). Für eine funktionelle Enzyme- und strukturelle Proteinausstattung der Lentiviren sorgt das psPAX2 Plasmid, welches die Gag-Pol Sequenz des humanen Immundefizienzvirus trägt (s. Abbildung 3, S. 43). Das gruppenspezifische Antigen (Gag) kodiert für verschiedene Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine des späteren Lentivirus, während im Pol-Bereich die genetische

Information für die virale Protease, reverse Transkriptase und Integrase liegt, welche unter anderem für den Einbau der verpackten Information in das Erbgut der Zielzelle nötig sind.

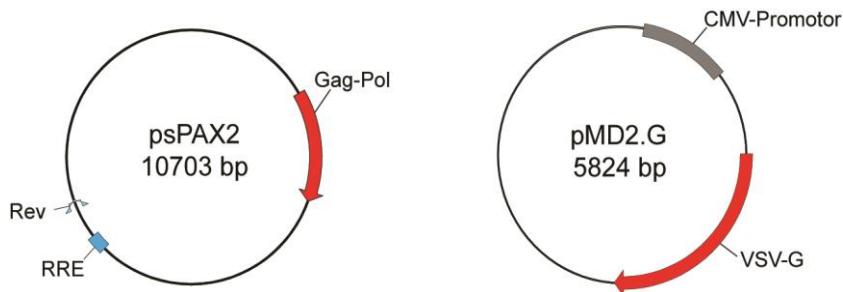


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verwendeten Verpackungsplasmide

psPAX2 exprimiert Proteine des gruppenspezifischen Antigens Gag (Matrix-, Kapsid-, Nukleokapsidproteine) und Pol-Leserahmens (Protease, reverse Transkriptase, Integrase). Des Weiteren kodiert es für einen Expressionsregulator für virale Proteine (Rev) und enthält die zugehörige Bindungsstelle (RRE). pMD2.G kodiert für das Hüllprotein G des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) mit vorgeschaltetem CMV-Promotor.

Zusätzlich enthält es die Information für einen posttranskriptionell aktiven Expressionsregulator viraler Gene (Rev) und die dazu passende Bindungsstelle (Rev responsive element, RRE).

Neben diesen beiden Verpackungsplasmiden, die für die Herstellung aller verwendeten Lentiviren benötigt wurden, gibt es noch drei weitere Plasmide, basierend auf dem pLKO-Grundkonstrukt (s. Abbildung 4, S. 44). Dieses enthält ein RRE sowie einen zentralen Polypurin Trakt (cPPT), welcher für eine verbesserte Einschleusung des viralen Genoms in den Zellkern sorgt (Rivière et al. 2010). Die long terminal repeats (LTR) spielen eine wichtige Rolle bei der Integration der viralen Gene, sowie deren Expression (Cimarelli und Darlix 2014). Das pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR Plasmid vermittelt die Expression des Tetracyclin-abhängigen Repressors als Fusionsprotein mit einer nuclear localization sequence (nls) und dem enhanced green fluorescent protein (EGFP). Der pLKO.DCMV.TetO.cIE1 Vektor transportiert die genetische Information für das IE1-Protein in die Zelllinien. Dem IE1-Gen vorgeschaltet ist ein Tetracyclin-abhängiger Operator (TetO), welcher die Transkription durch Tetracyclin regulierbar macht. Beide

Konstrukte besitzen den hCMV major IE Promotor/Enhancer, wobei der Promotor im IE1-Plasmid für eine abgeschwächte Expression trunkiert ist.

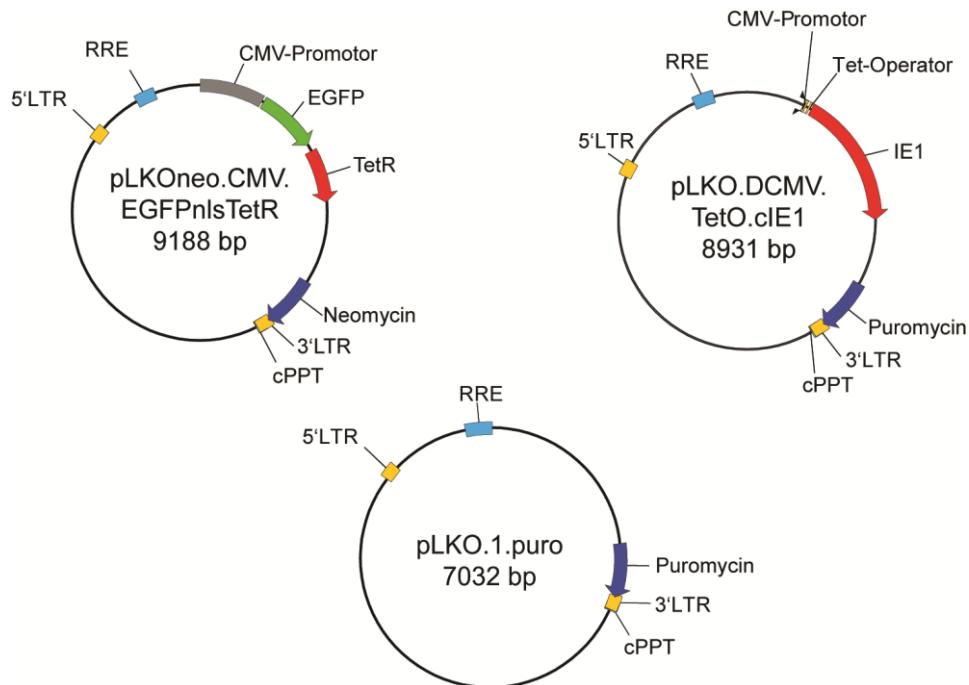


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren

Die Vektoren entstammen dem pLKO-Grundkonstrukt und haben unterschiedliche Besonderheiten. Der Vektor pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR enthält kodierende Sequenzen für den Tet-Repressor (TetR) als Fusion mit einem Kernlokalisierungssignal (nls) und einem Fluoreszenzprotein (EGFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors. Das pLKO.DCMV.TetO.clIE1-Plasmid enthält die IE1 kodierende Sequenz unter Kontrolle eines Tet-Operator gesteuerten trunkierten CMV-Promotors. Im pLKO-Grundkonstrukt ist zudem eine Resistenz gegen Puromycin bzw. Neomycin integriert.

Das pLKO.1.puro Konstrukt entspricht einem „leeren“ pLKO-Grundgerüst, um Kontrollzelllinien zu schaffen, die (wie die IE1-exprimierenden Zelllinien) durch Puromycingabe selektioniert werden können. Diese fünf Plasmide stellten im Folgenden die Basis für die Herstellung aller verwendeten Lentiviren dar.

C.1.4. Charakterisierung der verwendeten Plasmide durch Restriktionsverdau

Bevor die Plasmide zur Herstellung von rekombinanten Lentiviren eingesetzt werden konnten, mussten sie mittels Restriktionsenzymverdau auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Für jedes Plasmid wurden zwei Restriktionsenzyme ausgewählt, die an unterschiedlichen Stellen der DNA schneiden. Die zwei entstandenen Fragmente wurden anschließend durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Somit wurde kontrolliert, ob bei den Plasmiden während der Bakterienkultivierung (s. B.2.1.1, S. 21) oder Aufreinigung (s. B.2.1.2, S. 21) größere Deletionen oder Mutationen der DNA stattgefunden hatten.

Tabelle 11: Restriktionsenzymfragmente der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Größe	Restriktionsenzym	Fragmente (bp)	Nr.*
pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR	9188 bp	EcoRI	666	689
			8522	
		SpeI	2514	
			6674	
pMD2.G	5824 bp	EcoRI	1671	691
			4153	
		BglII	2479	
			3345	
psPAX2	10703 bp	EcoRI	4374	693
			6329	
		NocI	8087	
			2616	
pLKO.DCMV.TetO.cIE1	8931 bp	HincII	6896	696
			2035	
		XbaI	6645	
			2286	

* Nummer in der Plasmid-Datenbank der Arbeitsgruppe

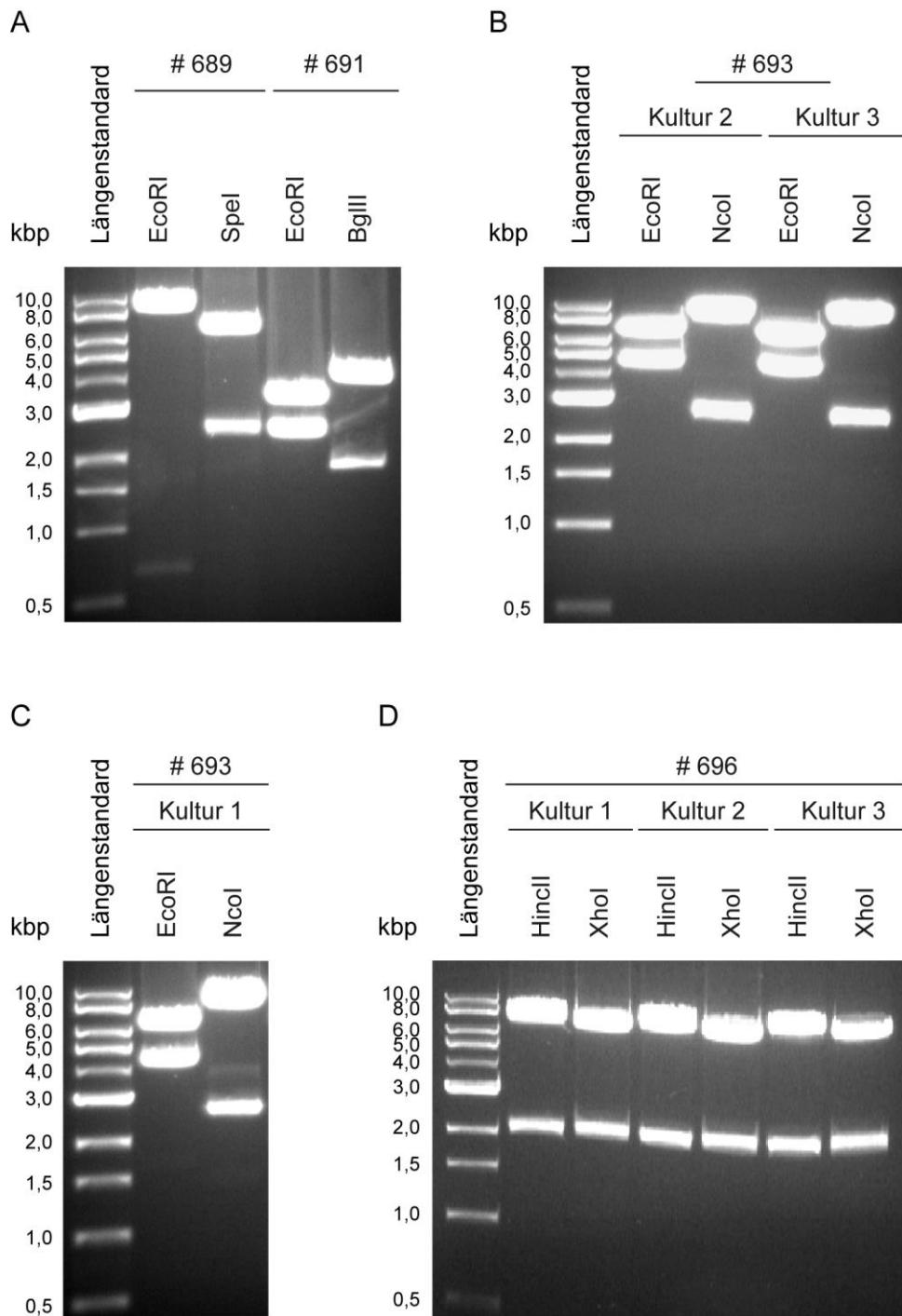


Abbildung 5: Charakterisierung der lentiviralen Plasmide pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR (# 689,A), pMD2.G (# 691,A), psPAX2 (# 693,B,C) und pLKO.hCMV.TetO.cIE1 (# 696,D) durch Restriktionsverdau

Jeweils 500 ng Plasmid-DNA wurde mit den angegebenen Enzymen gespalten und zusammen mit 500 ng der 1-kb Leiter (Längenstandard) in einem 1%igen EtBr-gefärbten Agarosegel aufgetrennt.

Da von einigen Plasmiden größere Mengen benötigt wurden, erfolgte die Kultivierung mehrmals (s. Abbildung 5 B, C, D; S. 46). Vergleicht man die Werte in der Tabelle 11 (S. 45)

so sieht man (s. Abbildung 5, S. 46), dass die Plasmide alle in die erwarteten Fragmente gespalten wurden und kann somit von der Richtigkeit der kodierten Information ausgehen.

C.1.5. Zeitlicher Ablauf der Produktion transgener Zelllinien

Die Herstellung transgener Zelllinien wurde nach einem definierten Zeitplan durchgeführt (s. Abbildung 6, S. 47). Zu Beginn wurden 293T-Zellen auf Kulturschalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden den konfluenten 293T-Kulturen die Plasmidkombinationen für die verschiedenen Lentiviren mittels Kalziumphosphatpräzipitation (s. B.2.3.6.1, S. 34) zugeführt. Ein Mediumwechsel mit NaButyrat-Zugabe und reduziertem Kulturmedium am nächsten Tag sorgte für optimale Kulturbedingungen. Nach etwa 19 h Kultivierung wurde der erste Lentivirus-haltige Überstand abgenommen und durch eine erneute Mediumzugabe noch einmal die Möglichkeit geschaffen, Lentiviren zu produzieren. Die so erhaltenen Lentiviruspräparationen wurden durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert (s. B.2.3.6.1, S. 34) und gemäß dem Transduktionsprotokoll (s. B.2.3.6.2, S. 36) in das Kulturmedium der gewünschten Zielzellen eingebracht.

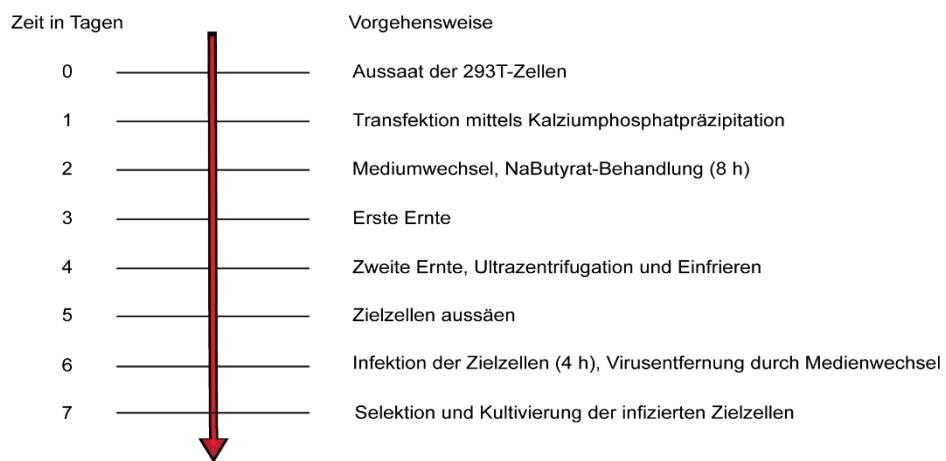


Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Produktion von transgenen Zelllinien

Es erfolgte im Verlauf eine Selektion der genveränderten Zelllinien mit Hilfe von eingebrachten Antibiotikaresistenzen und eine Kultivierung im geeigneten Zellkulturmedium (s. B.2.3.1, S. 30).

C.1.6. Effiziente Produktion rekombinanter Lentiviren in 293T-Zellen

Um möglichst infektiöse und hochtitrige Lentiviruspräparationen zu erhalten, ist die Wahl des produzierenden Zelltyps von großer Bedeutung.

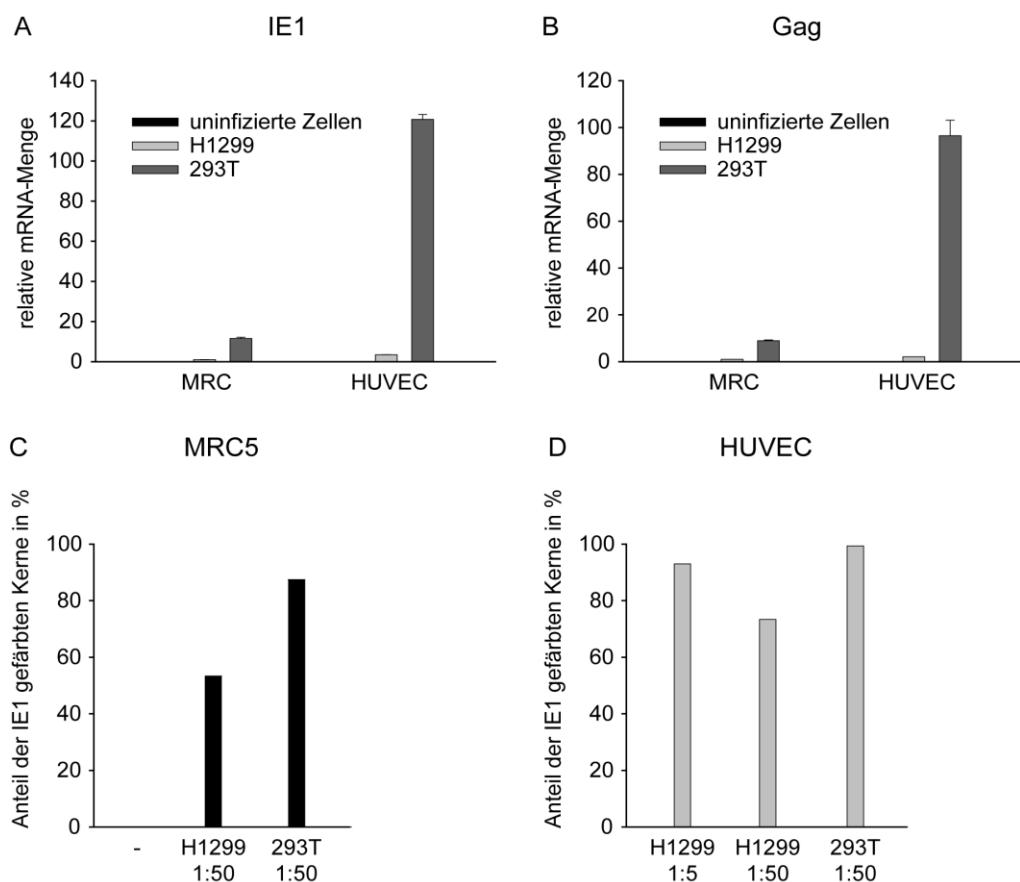


Abbildung 7: Vergleich der Lentivirusproduktion in H1299- und 293T-Zellen mittels RT-qPCR-Analyse (A, B) und Immunfluoreszenzmikroskopie (C, D)

(A,B) MRC5 und HUVEC wurden 24 h nach Aussaat mit ultrazentrifugiertem Lentivirusüberstand aus H1299- oder 293T-Zellen für 16,5 h inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und 48 h später die Isolierung der DNA und die RT-qPCR-Analyse. Es wurden die Mittelwerte aus jeweils 2 biologischen und 2

technischen Replikaten mit ihrer Standartabweichung aufgetragen. Zusätzlich wurden die Werte auf Tubulin normiert. (C,D) MRC5 und HUVEC wurden auf Deckgläsern ausgesät und 24 h später mit ultrazentrifugiertem Lentivirusüberstand aus H1299- oder 293T-Zellen in verschiedenen Verdünnungen für 16,5 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel und nach 24 h wurden Immunfluoreszenzpräparate erstellt. Es wurden zwischen 150 und 200 DAPI-gefärbte Kerne ausgezählt und der Anteil der IE1-positiv gefärbten Kerne ermittelt.

Die beiden Zelllinien H1299 und 293T wurden im Hinblick auf ihre Produktionsfähigkeit untersucht, indem sie unter identischen Bedingungen zur Herstellung von IE1-Lentiviren verwendet wurden. Mit den resultierenden Lentiviren wurden zwei verschiedene humane Zielzelllinien, MRC5 und HUVEC, infiziert und nachfolgend mittels RT-qPCR und Immunfluoreszenzmikroskopie auf IE1-Expression untersucht. In der RT-qPCR wurde zum einen die mRNA-Menge des IE1-Gens, zum anderen die des eingeschleusten Gag-Gens, welches für Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine kodiert, analysiert. Es zeigten sich in beiden Zielzelllinien deutlich erhöhte mRNA-Mengen der untersuchten Gene, wenn die Zellen mit dem Lentivirus aus 293T-Zellen infiziert wurden (s. Abbildung 7 A, B, S. 48). Diese Beobachtung konnte auch in einem weiteren Experiment, bei dem die Zielzelllinien mit verschiedenen Verdünnungen des ultrazentrifugierten Lentivirusstocks transduziert wurden, bestätigt werden. Hier zeigte sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie, dass bei infizierten HUVEC mit einer 1:50 Verdünnung des Lentivirus aus 293T-Zellen immer noch ein höherer Anteil an IE1-gefärbten Kernen nachweisbar war als bei einer 1:5 Verdünnung des H1299-Lentivirus (s. Abbildung 7 D, S. 48).

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse die deutliche Überlegenheit der 293T-Zellen gegenüber den H1299-Zellen bei der Lentivirusproduktion, weshalb für weitere Lentivirusproduktionen ausschließlich 293T-Zellen eingesetzt wurden.

C.1.7. Ultrazentrifugierte Lentivirus-Stocks verbessern die Transduktionsrate

Weitergehend wurde untersucht, ob durch eine Aufkonzentrierung der Lentivirus-haltigen Überstände durch Ultrazentrifugation eine verbesserte Transduktion der Zielzellen

erreicht wird. In H1299-Zellen erzeugte Lentiviren wurden mit dem Kulturüberstand abgenommen und ultrazentrifugiert (Konzentrationsfaktor ca. 180). HUVEC wurden anschließend mit Verdünnungen des Ultrazentrifugats, dem Lentivirus-haltigen Kulturüberstand oder frischem Kulturmedium behandelt. In der Immunfluoreszenzanalyse zeigte sich ein höherer Anteil an IE1-gefärbten Kernen in dem Präparat, dem ultrazentrifugierte Lentiviren mit einer 1:11,5 Verdünnung zugegeben worden waren als in dem mit unkonzentriertem Lentivirus-haltigen Überstand transduzierten Präparat (s. Abbildung 8, S. 50). In den nachfolgenden Versuchen wurden die erzeugten Lentiviren deshalb ultrazentrifugiert bevor sie in einer angepassten Verdünnung den Zielzellkulturen zugesetzt wurden.

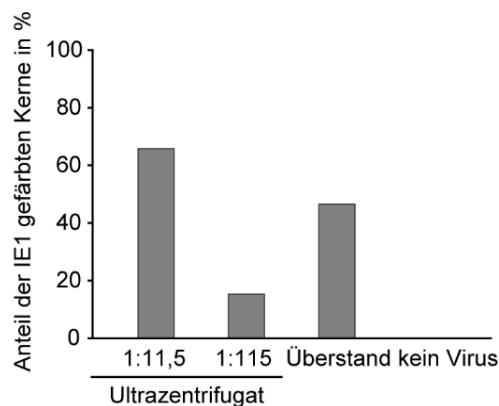


Abbildung 8: Verbesserte Transfektionsrate durch Ultrazentrifugation der Lentivirus-haltigen Überstände

HUVEC wurden auf Deckglässchen ausgesät und 24 h später mit IE1-Lentivirus aus H1299-Zellen transfiziert. Dabei wurde ein in einer Ultrazentrifuge konzentriertes IE1-Lentivirus in verschiedenen Verdünnungen (1:11,5 und 1:115) eingesetzt sowie unkonzentrierter Überstand und normales Kulturmedium. 17 h später erfolgte ein Mediumwechsel und 24 h danach die Anfertigung von Immunfluoreszenzpräparaten mit Hilfe des m-anti-IE1-Antikörpers und sekundär mit m-anti-Alexa 594 (s. B.1.1, S.15). Es wurden 150 bis 200 DAPI-gefärbte Zellkerne ausgezählt und der Anteil der IE1-positiven Kerne bestimmt.

C.1.8. Keine verbesserte Lentivirusaufnahme durch Zentrifugation während der Transduktion

Für den Gentransfer mit Lentiviren wurde auch eine verbesserte Transduktionsrate durch Zentrifugation der Kulturgefäße während der Inkubation mit dem Lentivirus beschrieben („centrifugal enhancement“) (Biagi et al. 2001). Um diese mögliche Verbesserung der Transduktion zu überprüfen, wurde ein in H1299-Zellen produziertes, ultrazentrifugiertes IE1-Lentivirus in zwei verschiedenen Verdünnungen mit HUVEC inkubiert. In der Immunfluoreszenzmikroskopie fanden sich deutliche Unterschiede der ausgezählten IE1-positiven Kerne in Abhängigkeit von der Konzentration des Lentivirus. So waren bei einer Verdünnung von 1:115 zwischen 10 und 15% der Kerne IE1-positiv, bei der 1:11,5 Verdünnung lag deren Anteil bei knapp über 60% (s. Abbildung 9, S. 51).

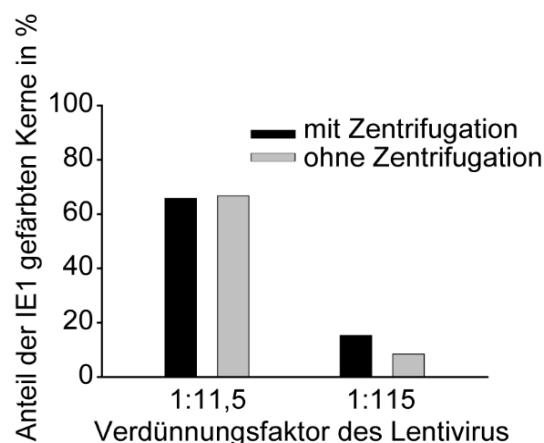


Abbildung 9: Zentrifugation während der Transduktion führt zu keiner verbesserten Lentivirusaufnahme

HUVEC wurden auf Deckglässchen ausgesät und 24 h später mit IE1-Lentivirus aus H1299-Zellen transfiziert. Hierbei wurde ein in einer Ultrazentrifuge konzentriertes IE1-Lentivirus in verschiedenen Verdünnungen (1:11,5 und 1:115) eingesetzt. Zu Beginn der Transfektion wurde eine der beiden 6-well Platten zentrifugiert (2 h, 1200 g, 25°C) und anschließend mit der zweiten 6-well Platte bei 37°C inkubiert. 17 h später erfolgte ein Mediumwechsel und 24 h danach die Anfertigung von Immunfluoreszenzpräparaten mit Hilfe des m-anti-IE1-Antikörpers und sekundär mit m-anti Alexa 594 (s. B.1.1, S. 15). Es wurden 150 bis 200 DAPI gefärbte Zellkerne ausgezählt und der Anteil der IE1-positiven Kerne bestimmt.

Ein geringfügig (5%) höherer Anteil an IE1-positiven Kernen war, im direkten Vergleich zwischen Zentrifugation während der Transduktion und einer Transduktion unter Normalbedingungen, nur bei der höheren Verdünnung (1:115) nachweisbar. Bei Einsatz von weniger verdünntem Lentivirusstock fanden sich in dem unzentrifugierten Transduktionspräparat sogar marginal mehr IE1-positive Zellkerne. Da sich der positive Effekt einer Transduktion unter Zentrifugation bei höherer Lentiviruskonzentration nicht bestätigen ließ, kam dieses Verfahren in den folgenden Versuchen nicht mehr zur Anwendung.

C.1.9. Zusammenfassung

Mit Hilfe der durchgeführten Versuche konnte das bisherige Protokoll der Arbeitsgruppe zur Herstellung von rekombinanten Lentiviren weiter verbessert werden. Die Lentivirus-kodierenden Plasmide zeigten im Restriktionsenzymverdau die erwarteten Spaltprodukte, aufgrund dessen von einer Richtigkeit der kodierten Information auszugehen ist. Im Vergleich der Produktionszellen konnte eine Überlegenheit der 293T-Zelllinie im Vergleich mit der H1299-Zelllinie nachgewiesen werden, weswegen für weitere Lentivirus-präparationen ausschließlich 293T-Zellen verwendet wurden. Eine Aufkonzentrierung der Lentiviren aus Lentivirus-haltigem Überstand mittels Ultrazentrifugation verbesserte bei geeigneter Verdünnung die Transduktionsrate der Zielzellen. Eine Zentrifugation der Zielzellen während der Transduktion hatte nur bei geringer Lentiviruskonzentration einen leicht positiven Einfluss und ist nicht geeignet, die Transduktionsrate bei höheren Konzentrationen effektiv zu verbessern.

C.2. Untersuchung der IE1-Antwort in humanen Fibroblasten

C.2.1. Überblick

Die Aktivierung von verschiedenen ISG durch IE1-Expression in humanen Fibroblasten wurde bereits beschrieben (Knoblauch et al. 2011). Diese Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit zum Teil überprüft und weitere Fragestellungen, die sich daraus ergaben, untersucht.

Der Einfluss von IE1 auf die Regulation humaner Gene (s. C.2.2, S. 54), mögliche Parallelen zu einer IFN γ -beeinflussten Genexpression (s. C.2.3, S. 55) und die Auswirkungen von IE1 auf die Expression ausgewählter CXCR3-Liganden (s. C.2.4, S. 56) dienten zur Validierung der Reproduzierbarkeit der bereits veröffentlichten Ergebnisse (Knoblauch et al. 2011) und als Grundlage für weiterführende Experimente. Diese beschäftigten sich mit der Expressionskinetik bestimmter humaner Gene bei einer Expression von IE1 über einen längeren Zeitraum hinweg (s. C.2.5, S. 57) und der Reaktion auf IFN γ nach vorangegangener IE1-Expression (s. C.2.6, S. 59; C.2.7, S. 61). Ebenso wurde mittels neutralisierender Antikörper (s. C.2.9, S. 64) und siRNA basiertem IFN γ -Rezeptor Knockdown (s. C.2.10, S. 65.) überprüft, inwieweit eine exogene IFN γ -Stimulation oder die IE1-Expression für die ISG-Aktivierung verantwortlich sind. Außerdem wurde untersucht, inwieweit das Sekretom IE1-produzierender Zellen einen fördernden Einfluss auf die Infektion von Fibroblasten mit einem klinischen hCMV-Isolat hat (s. C.2.11, S. 68).

C.2.2. Expression des IE1-Proteins führt zu Aktivierung der humanen Gene CXCL10, CXCL11 und GBP4

Die Wirkung des hCMV-IE1-Proteins auf die menschliche Zelle im Hinblick auf die Regulation der Genexpression wurde bereits untersucht, wobei erhöhte mRNA-Mengen bestimmter humaner Gene nachgewiesen wurden (Knoblauch et al. 2011). Induziert man in humanen TetR-IE1-Fibroblasten für 72 h die Expression des IE1-Proteins, zeigt sich im Vergleich mit nur TetR-exprimierenden Fibroblasten eine erhöhte Menge an mRNA von Chemokinen der CXCL-Gruppe.

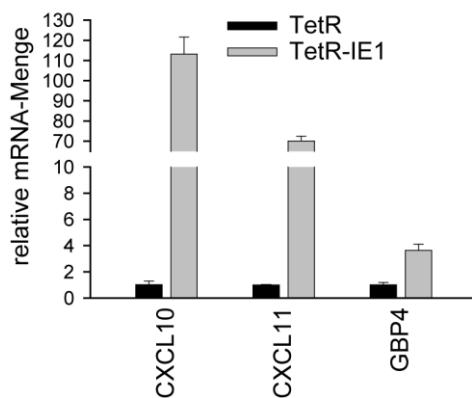


Abbildung 10: RT-qPCR-Analyse der Gene CXCL10, CXCL11 und GBP4 in TetR- und TetR-IE1-Zellen

TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin (1 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relativen mRNA-Mengen der angegebenen Gene mittels RT-qPCR bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Zudem wurden die Werte auf Tubulin normiert und relativ zu den Ergebnissen in TetR Zellen (=1) aufgetragen.

So fand sich in den TetR-IE1-Zellen ein ungefähr 100-fach höherer Wert an CXCL10 Transkripten als in den TetR-Fibroblasten (s. Abbildung 10, S. 54). Bei dem Chemokin CXCL11 betrug der Unterschied in der Transkriptmenge zwischen IE1-exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen das etwa 70-fache. Auch die Transkripte für das GBP4-Protein waren in den TetR-IE1-Zellen in 4-facher Menge vorhanden.

C.2.3. IE1 induziert eine IFN γ -ähnliche Antwort

Die von IE1 aktivierten Gene sind bekannt dafür, dass deren Transkription auch durch IFN induziert wird. Um dies zu validieren, wurden Fibroblasten mit IFN β , IFN γ oder nur dem Lösungsmittel behandelt und im Anschluss der Einfluss auf die mRNA-Mengen der ausgewählten Gene untersucht. Relativ zur unbehandelten Probe zeigte sich bei CXCL10 durch IFN β eine relative Steigerung der Transkriptmenge auf das etwa 150-fache und durch IFN γ auf das bis zu 600-fache (s. Abbildung 11, S. 55).

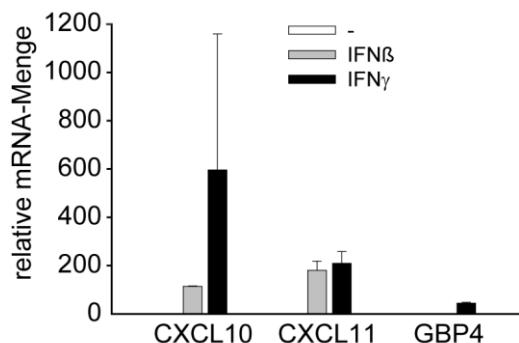


Abbildung 11: RT-qPCR-Analyse der IFN-Induzierbarkeit IE1-abhängig regulierter Gene

TetR-Zellen wurden für 24 h mit Lösungsmittel (-), IFN β (10 ng/ml) oder IFN γ (10 ng/ml) behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relativen mRNA-Mengen der angegebenen Gene mittels qPCR bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Sie wurden auf Tubulin normiert und relativ zu den Ergebnissen nach Lösungsmittelbehandlung (=1) aufgetragen.

Bei CXCL11 induzierten beide IFN mRNA-Mengen, die dem etwa 200-fachen der Kontrolle entsprachen. In der Untersuchung von GBP4 ergab sich eine etwa 40-fache Steigerung durch IFN γ , wohingegen IFN β keine erhöhte mRNA-Menge zur Folge hatte. Vergleicht man diese Daten mit der Aktivierung dieser Gene durch IE1 (s. C.2.2, S. 54), so ist nachvollziehbar, dass IE1 eine Expressionsantwort erzeugt, die IFN γ -ähnlich ist.

C.2.4. Einfluss des IE1-Proteins auf die Expression der CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in Fibroblasten

Eine genauere Untersuchung der CXCL9-, CXCL10- und CXCL11-Induktion nach IE1-Expression sollte zeigen, mit welcher Kinetik IE1 wirkt. Die verschiedenen Kontrollen in diesem Experiment waren Fibroblasten, die mit normalen Zellkulturmedium behandelt wurden (MOCK), TetR-Fibroblasten, welche kein IE1 exprimieren, aber auch den Auswirkungen einer Infektion durch das TetR-Lentivirus ausgesetzt waren und TetR-Puro-Fibroblasten, welche anstatt des IE1 nur ein Puromycin-Resistenzgen tragen, das mit einer Lentivirusinfektion in die Zellen eingebracht wurde.

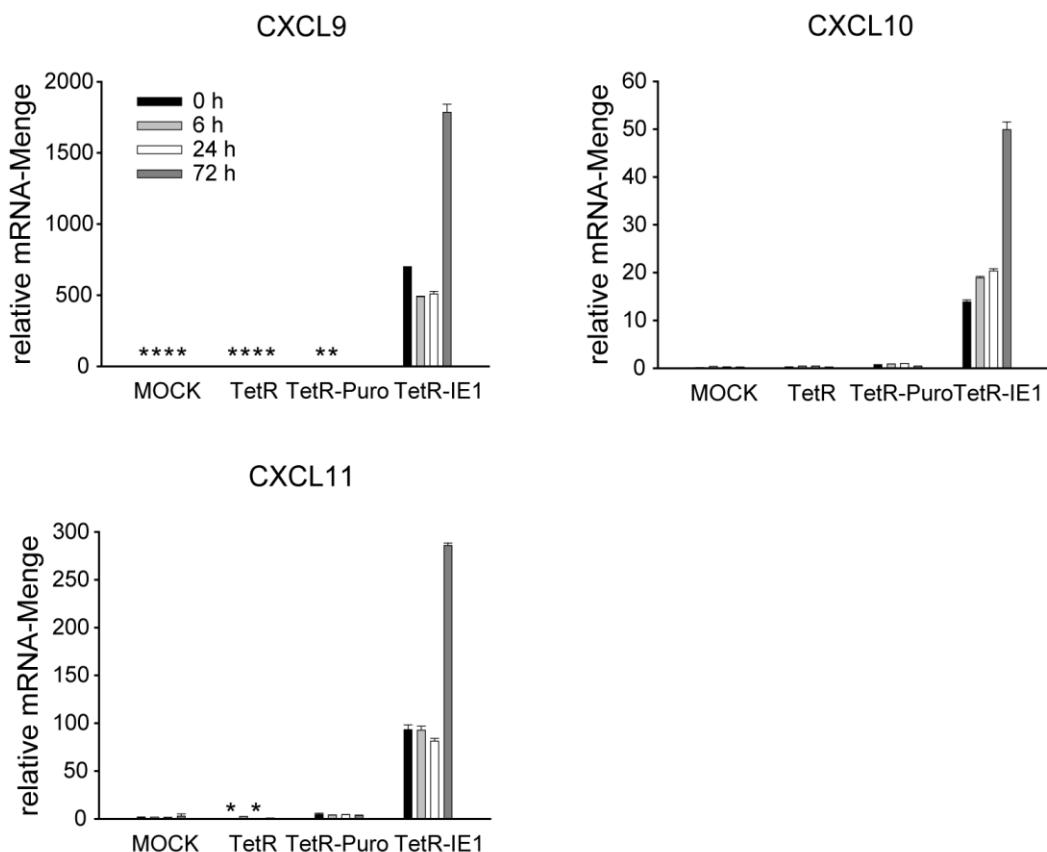


Abbildung 12: RT-qPCR-Analyse der Gene CXCL9, CXCL10, CXCL11 und IE1 in unbehandelten, TetR-TetR-Puro- und TetR-IE1-Fibroblasten

Transduzierte bzw. unbehandelte MRC5-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten vor Zellernte (72 h, 24 h, 6 h, 0 h= uninduziert) mit Doxycyclin (1 µg/ml) behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA

isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relativen mRNA-Mengen der angegebenen Gene mittels qPCR bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Diese wurden auf Tubulin normiert und relativ zu den Ergebnissen der TetR-Puro-24 h Probe (=1) aufgetragen. Alle mit * markierten Balken waren nicht valide. Als Ausschlusskriterium wurde zum einen der Verlauf der Schmelzkurve verwendet, zum anderen der Wert der höchsten Standardabweichung einer TetR-IE1-Probe multipliziert mit 2. Alle Proben deren Standardabweichung größer war als dieser Wert wurden aussortiert.

Somit ist der TetR-IE1-Zelllinie die TetR-Puro-Zelllinie am ähnlichsten und der 24 h Wert dieser Zellen wurde als Vergleichswert festgelegt. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, um ein differenzierteres Bild der IE1-abhängigen Aktivierung zu bekommen. Zu Beginn der Induktion fand sich bei allen drei Genen eine deutlich erhöhte mRNA-Menge im Vergleich zu der TetR-Puro-Kontrolle. Nach 6 h bzw. 24 h konnte man bei CXCL9 und CXCL11 einen dezenten Abfall der Transkriptionsmengen erkennen, bei CXCL10 ist dagegen ein leichter Anstieg ersichtlich (s. Abbildung 12. S. 56). Alle CXCR3-Liganden zeigten aber nach 72 h IE1-Expression eine deutliche Zunahme ihrer Transkription. Somit kann festgestellt werden, dass es im Verlauf der IE1-Expression in humanen Fibroblasten zu einer verstärkten Transkription der CXCR3-Genfamilie mit zeitlich verzögter Kinetik kommt.

C.2.5. Langzeitinduktion von IE1 in Fibroblasten zeigt eine maximale Expression von CXCL10 und GBP4 nach 10 Tagen

Um die Kinetik der IE1-abhängigen Antwort noch besser zu verstehen, wurden TetR-IE1-Fibroblasten über einen Zeitraum von 14 Tagen entweder zur Expression von IE1 mit Doxycyclin behandelt oder unbehandelt gelassen. Die ersten Proben wurden an Tag 4 nach Beginn der Induktion geerntet, da die ersten 72 h bereits in Vorexperimenten (s. C.2.2, S. 54; C.2.4, S. 56) untersucht worden waren. Mit Hilfe der RT-qPCR wurden die mRNA-Mengen von IE1, GBP4 und CXCL10 bestimmt. An Tag 4 nach Beginn der IE1-Induktion lag im Vergleich zum uninduzierten Zustand etwa 8-fach mehr IE1-mRNA vor, welche bis

zu Tag 8 etwa auf diesem Niveau blieb (s. Abbildung 13, S. 58). Bei den letzten drei Messzeitpunkten betrug die mRNA-Menge nur noch das etwa 4-fache des uninduzierten Zustands. Ein anderes Bild zeigte sich bei der Analyse der GBP4-Transkripte. Hier erfolgte eine progrediente Steigerung der mRNA-Mengen von Tag 4 bis Tag 10 nach Induktionsbeginn auf ein Maximum des etwa 4-fachen der uninduzierten Probe an Tag 4. Anschließend fielen die Werte wieder ab und zeigten zum letzten Messzeitpunkt das Niveau von Tag 6. Auffällig war ein relativ hoher Wert der uninduzierten Probe an Tag 4 nach Induktionsbeginn, der über dem Wert der induzierten Probe zu diesem Zeitpunkt lag.

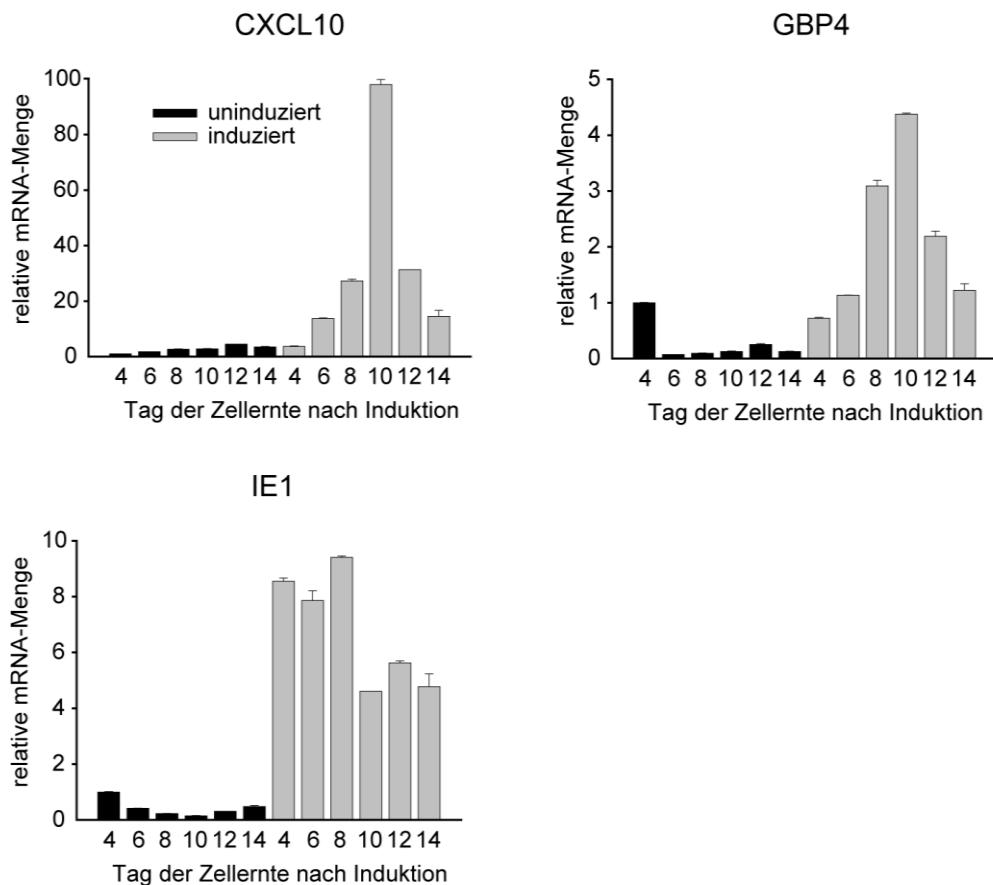


Abbildung 13: Die Langzeitinduktion von IE1 in Fibroblasten zeigt eine maximale Expression von CXCL10 und GBP4 nach 10 Tagen

TetR-IE1-Fibroblasten wurden auf 12-well-Platten ausgesät und für 72 h mit Doxycyclin (1 µg/ml) induziert oder unbehandelt gelassen. Ab dem Tag 4 nach Beginn der Induktion wurde täglich das Medium gewechselt, wobei die induzierten Zellen weiter mit Doxycyclin (1 µg/ml) behandelt wurden. Alle zwei Tage wurden Zellen geerntet. Nachfolgend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR

die relativen mRNA-Mengen der angegebenen Gene bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Diese wurden auf Tubulin normiert und relativ zu dem Ergebnis der ersten Ernte der uninduzierten TetR-IE1-Zellen angegeben.

Generell zeigte die Untersuchung der CXCL10 Transkription ein ähnliches Bild. Auch hier erfolgte eine kontinuierliche Steigerung der mRNA-Mengen bis zum Tag 10, wobei hier das über 90-fache an Transkription des Referenzwertes erreicht wurde. Auch bei CXCL10 erfolgte anschließend ein rascher Abfall und die Transkriptionsmenge am letzten Messzeitpunkt befand sich, wie auch bei GBP4, auf dem Niveau des Messwerts an Tag 6. Zusammenfassend konnte eine maximale Transkription der untersuchten ISGs 10 Tage nach Beginn der IE1-Induktion festgestellt werden. Eine länger andauernde IE1-Aktivität ging mit sinkenden mRNA-Mengen von CXCL10 und GBP4 einher.

C.2.6. IE1-Präexpression hat nur geringen Einfluss auf die Aktivierung von CXCL10 durch IFN γ

Da IE1 mit der Regulation von ISG in Verbindung gebracht werden kann, stellte sich die Frage, ob eine zurückliegende IE1-Expression einen verstärkenden Effekt auf die Aktivierung von ISGs durch IFN γ hat. Hierfür wurden TetR-IE1-Fibroblasten verwendet, welche mit Doxycyclin induziert oder uninduziert gelassen wurden. 9 Tage nach Induktion wurde je eine Kultur der Zellen mit IFN γ stimuliert oder unbehandelt gelassen. Als Kontrolle dienten gleich behandelte TetR-Puro-Fibroblasten, von denen die IFN γ -behandelten Zellen als Referenz auf 1 gesetzt wurden. Erwartungsgemäß zeigte sich in der Auswertung der RT-qPCR bei der TetR-Puro-Kontrolle ohne IFN γ keine Transkription von CXCL10-mRNA. Durch IFN γ -Behandlung zeigte sich eine deutliche Steigerung der mRNA-Menge, die durch Vergleich mit den TetR-IE1-Zellen einen Rückschluss auf einen möglichen positiven Effekt von IE1 auf die IFN γ -abhängige Aktivierung von CXCL10 erlaubte (s. Abbildung 14, S. 60). Uninduzierte und nicht mit IFN γ -stimulierte TetR-IE1-Zellen zeigten, wie erwartet, keine CXCL10-Expression. Bei den nur mit Doxycyclin

behandelten TetR-IE1-Zellen war der Effekt von IE1 auf die CXCL10-Aktivierung zwar erkennbar, aber im Vergleich zur Situation nach IFN γ -Stimulation doch sehr gering. Die beiden TetR-IE1-Proben, welche mit IFN γ stimuliert worden waren, zeigten eine erhöhte CXCL10-mRNA-Menge gegenüber der TetR-Puro-Probe. Ohne vorangegangene Doxycyclinbehandlung erreichten IFN γ -stimulierte TetR-IE1-Zellen etwa die etwa 1,7-fache höhere CXCL10-mRNA-Menge im Vergleich zu TetR-Puro-Zellen. Möglicherweise produzieren die TetR-IE1-Zellen auch in uninduziertem Zustand eine gewisse Grundmenge an IE1, was den Unterschied erklären könnte.

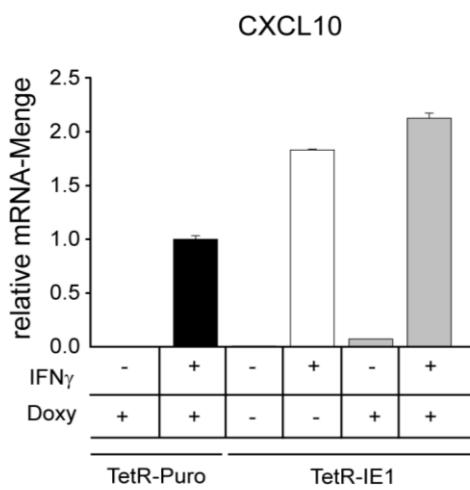


Abbildung 14: Geringer Einfluss der IE1-Expression auf eine spätere IFN γ -Stimulation

TetR-Puro- und TetR-IE1-Zellen wurden ausgesät und sieben Tage später für 72 h mit Doxycyclin (1 μ g/ml) behandelt. Sie wurden für acht Tage unbehandelt gelassen und am neunten Tag mit IFN γ behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach 6 h erfolgte die Zellernte. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relativen mRNA-Mengen von CXCL10 bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Alle Werte wurden auf Tubulin normiert und die IFN γ -stimulierte TetR-Puro-Probe wurde auf 1 gesetzt.

Die mit Doxycyclin induzierte TetR-IE1-Probe zeigte eine etwa 2,1-fache Erhöhung der relativen mRNA-Mengen von CXCL10 im Vergleich zur TetR-Puro-Probe. Der Unterschied zwischen TetR-Puro- und TetR-IE1-Zellen hinsichtlich eines Einflusses von IE1 auf die CXCL10-Aktivierung war somit ersichtlich, der vermutete Effekt einer vorangegangenen IE1-Expression auf die Aktivierung der ISGs war aber eher gering. Somit kann festgestellt

werden, dass die vorangegangene Expression von IE1 in humanen Fibroblasten nur einen geringen verstärkenden Effekt auf die Expressionsaktivierung von ISGs durch IFN γ hat.

C.2.7. Kein synergistischer Effekt der IE1-Expression auf die Gleichgewichtsmenge von CXCL10 nach IFN γ -Stimulation

Wie im vorangehenden Experiment beobachtet werden konnte (s. C.2.6, S. 59), führte die Expression von IE1 in Fibroblasten mit nachfolgender IFN γ -Stimulation nur zu einer leicht erhöhten Antwort der ISGs. Daran anschließend stellte sich die Frage, ob trotzdem ein synergistischer Effekt auf die ISG-Aktivierung besteht, welcher bei geringen Konzentrationen von IFN γ nachweisbar ist. Als Kontrollen dienten TetR-Fibroblasten, die genau wie die TetR-IE1-Fibroblasten für 72 h mit Doxycyclin (1 μ g/ml) stimuliert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h mit IFN γ in Konzentrationen zwischen 0,016 und 10 ng/ml behandelt. Es konnte eine gleichmäßige Induktion von IE1 in allen TetR-IE1-Zellen nachgewiesen werden (s. Abbildung 15 B, S. 61).

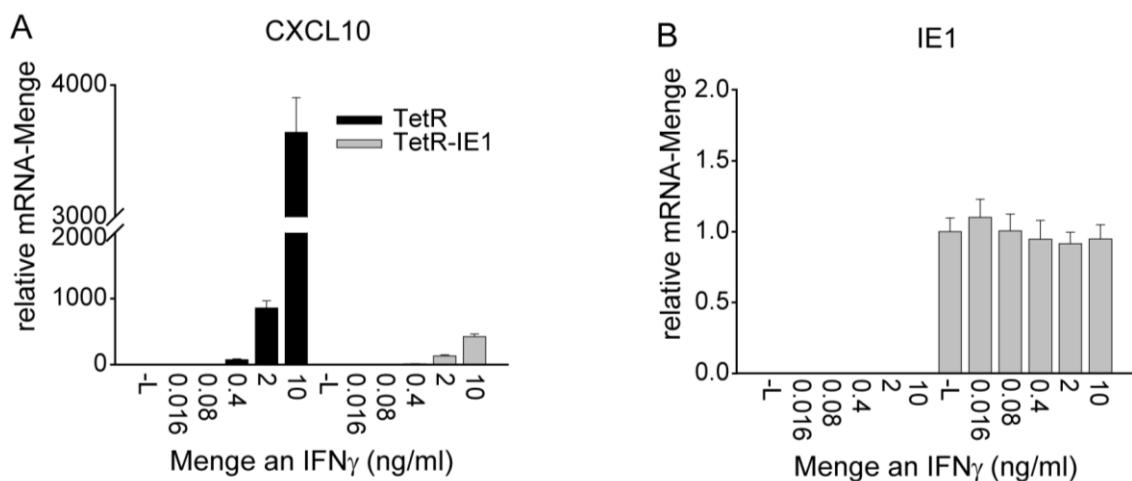


Abbildung 15: Kein synergistischer Effekt der IE1-Expression auf die Gleichgewichtsmenge von CXCL10 nach IFN γ -Stimulation

TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin (1 μ g/ml) behandelt. Für die letzten 24 h wurde zu den Kulturen IFN γ (10 ng/ml) unverdünnt und in den Verdünnungen 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 oder

Lösungsmittel (-L) gegeben, bevor die Zellernte erfolgte. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relative mRNA Menge von CXCL10 und IE1 mittels RT-qPCR bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet und auf Tubulin normiert.

Die relativen mRNA-Mengen von CXCL10, welches stellvertretend für die ISGs untersucht wurde, zeigten bei beiden Zelltypen einen ähnlichen Verlauf (s. Abbildung 15 A, S. 61). Es erfolgte ein starker Anstieg der nachgewiesenen mRNA analog zur Steigerung der IFN γ -Konzentration. Auffällig war, dass in den TetR-Zellen, verglichen mit den TetR-IE1-Zellen, schon bei niedrigeren Konzentrationen erhöhte Mengen an CXCL10-mRNA detektierbar waren. Auch bei maximaler IFN γ -Stimulation mit 10 ng/ml wiesen die TetR-Zellen deutlich höhere mRNA-Mengen auf, als die TetR-IE1-Zellen. Die IFN γ -Gabe bei den TetR-IE1-Fibroblasten zeigte bei keiner der untersuchten Konzentrationen eine synergistische Wirkung auf die Expressionsaktivierung des untersuchten ISG. Somit muss konstatiert werden, dass eine IE1-Expression keinen verstärkenden Einfluss auf die CXCL10-Mengen nach IFN γ -Stimulation ausübt.

C.2.8. Expression von IE1 hat keinen Einfluss auf die Kinetik der ISG-Aktivierung nach IFN γ -Stimulation

Bei der weiteren Charakterisierung des Zusammenspiels von IE1 und IFN γ stellte sich auch die Frage, ob die Expression von IE1 bei einer IFN γ -Gabe zu verschiedenen Zeitpunkten eine positive Auswirkung auf die Transkription von ISGs am Beispiel von CXCL10 hat. Denkbar wäre, dass die CXCL10-Genexpression in IE1-exprimierenden Zellen bereits zu früheren Zeitpunkten ansteigt als in TetR-Zellen. Hierfür wurden TetR-IE1- und TetR-Zellen für 72 h mit Doxycyclin stimuliert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten vor der gemeinsamen Zellernte mit IFN γ (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt gelassen. Bei der Analyse der IE1-Expression zeigte sich ein gleichmäßiges Niveau der IE1-mRNA in allen TetR-IE1-Zellproben, während in TetR-Zellen, erwartungsgemäß keine IE1-mRNA nachweisbar war (s. Abbildung 16 B, S. 63). Die CXCL10 Transkription zeigte bei TetR- und

TetR-IE1-Zellen einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. Das Maximum der CXCL10-mRNA-Menge war bei beiden Zelltypen bei einer IFN γ -Gabe 12 h vor dem Erntezeitpunkt detektierbar (s. Abbildung 16 A, S. 63). Wie bereits im vorherigen Experiment beobachtet (s. C.2.7, S. 61), lagen die relativen CXCL10-mRNA-Mengen der TetR-Zellen deutlich über den Werten in TetR-IE1-Zellen.

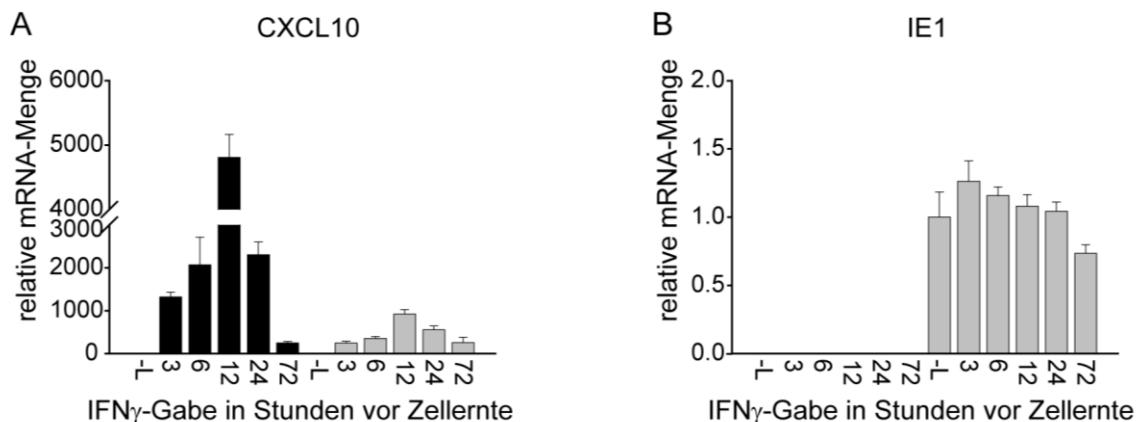


Abbildung 16: Die Expression von IE1 hat keinen Einfluss auf die Kinetik der CXCL10-Aktivierung nach IFN γ -Stimulation

TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin (1 μ g/ml) behandelt. Es erfolgte eine Gabe von IFN γ (10 ng/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten oder eine Lösungsmittelbehandlung (-L) und anschließend eine zeitgleiche Zellernte. Danach wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relative mRNA-Menge von CXCL10 und IE1 mittels RT-qPCR bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Diese wurden auf Tubulin normiert.

Eine synergistische Wirkung von IE1 und IFN γ zeigte sich während dieses Zeitverlaufs nicht, man kann anhand dieses Experiments sogar eher von einer abgeschwächten Wirkung von IFN γ nach IE1-Expression ausgehen. Mögliche Ursachen müssten aber noch weitergehend untersucht werden. Aus diesem Zeitverlauf ist dennoch der Schluss zu ziehen, dass eine maximale Aktivierung von CXCL10 durch IFN γ etwa 12 h nach IFN-Gabe nachweisbar ist. Des Weiteren hat die IE1-Expression keinen verstärkenden Effekt auf die CXCL10 Transkription oder Einfluss auf deren Kinetik.

C.2.9. Kein Einfluss von IFN-neutralisierenden Antikörpern auf die IE1-vermittelte Aktivierung humaner Gene

Eine denkbare Erklärung für die IE1-vermittelte Aktivierung von ISGs wäre, dass IE1-exprimierende Fibroblasten auto- oder parakrin IFN γ produzieren, welches wiederum die ISGs aktiviert. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurden TetR- und TetR-IE1-Zellen für 72 h mit Doxycyclin stimuliert und in den letzten 24 h mit IFN β , IFN γ oder Lösungsmittel behandelt.

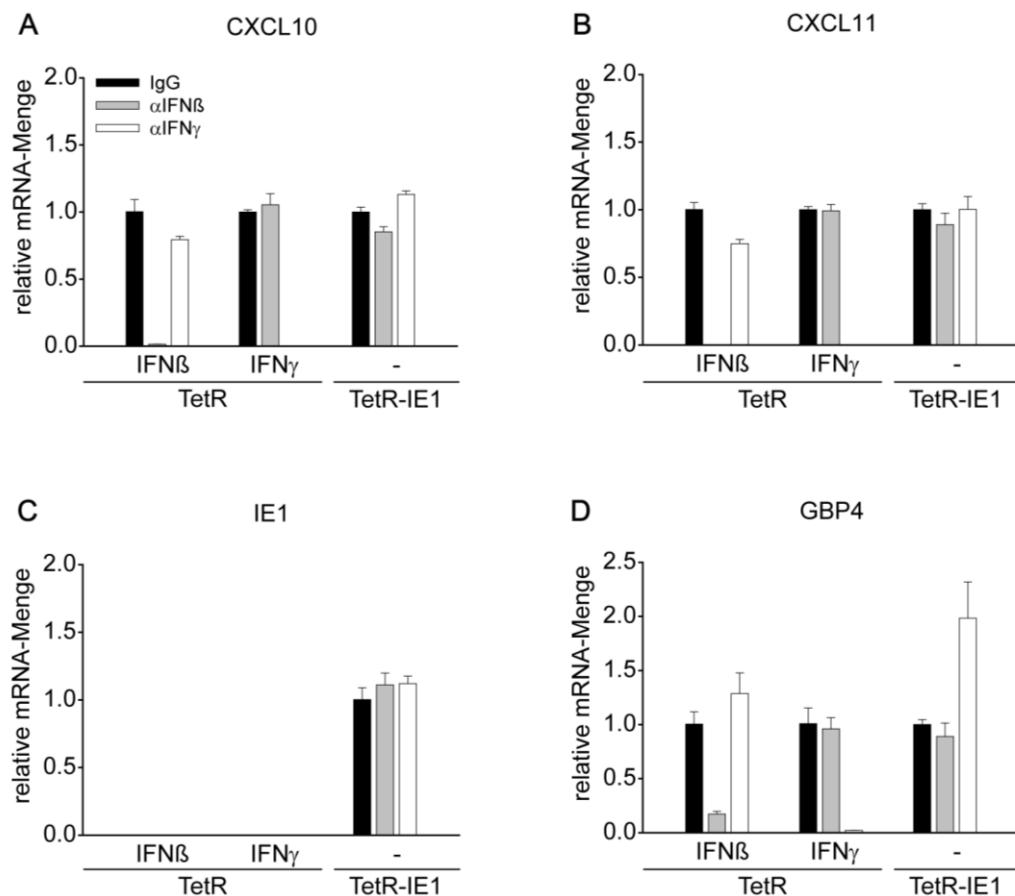


Abbildung 17: Die IE1-vermittelte ISG-Induktion ist unabhängig von IFN-neutralisierenden Antikörpern

TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden für 72 h mit Doxycyclin (1 μ g/ml) behandelt. Für die letzten 24 h wurde zu den Kulturen IFN β (10 ng/ml), IFN γ (10 ng/ml) oder Lösungsmittel (-) gegeben. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relative mRNA-Menge der angegebenen Gene

mittels RT-qPCR bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Diese wurden auf Tubulin normiert. Die IE1-Expression wird im Vergleich zu den IgG behandelten TetR- und TetR-IE1-Zellen (=1) gezeigt.

Außerdem wurden Antikörper gegen die IFN eingesetzt, als Kontrolle wurde unspezifisches Immunglobulin G (normal goat IgG, AB-108-C, R&D Systems Inc) verwendet. Nach Aufarbeitung der Proben wurden in der RT-qPCR unterschiedliche ISGs untersucht (CXCL10, CXCL11, GBP4). Wie erwartet konnte spezifische IE1-mRNA nur in den stimulierten TetR-IE1-Fibroblasten detektiert werden (s. Abbildung 17 C; S. 64). Betrachtet man die Analyse der CXCL10 Transkription, so stellt man zuerst fest, dass sich die mRNA-Mengen der Proben, die mit dem Kontroll-Antikörper behandelt wurden, etwa auf dem gleichen Niveau befinden. Bei den IFN β -stimulierten Zellen lässt sich in der anti-IFN β -Antikörperprobe kaum CXCL10-mRNA nachweisen. Analog verhält es sich bei IFN γ -stimulierten Zellen mit IFN γ -Antikörperegabe (s. Abbildung 17, S. 64). Somit ist von der Funktionsfähigkeit der beiden Antikörper auszugehen. Betrachtet man die mRNA-Analyse aus den TetR-IE1-Zellen so zeigten sich hier trotz Zugabe der IFN-spezifischen Antikörper erhöhte CXCL10-Werte. Bei der Untersuchung von GBP4 und CXCL11 zeigte sich ein ähnliches Bild. Es ist somit davon auszugehen, dass IFN nicht an der IE1-vermittelten ISG-Induktion beteiligt sind.

C.2.10. Geringer Einfluss des IFN γ -Rezeptor Knockdown auf die IE1-vermittelte Aktivierung humaner Gene

Nachdem sich kein Hinweis dafür finden konnte, dass eine mögliche IE1-vermittelte exogene IFN-Stimulation zur Aktivierung der untersuchten ISGs führt (s. C.2.9, S. 64), bestand die Möglichkeit, dass eine andere Substanz autokrin bzw. parakrin zu einer Aktivierung des IFN γ -Rezeptors und des zugehörigen Signalwegs führt. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, erfolgte eine Herabregulation der IFN γ -Rezeptoren mittels siRNA, infolgedessen auch die ISG-Antwort entsprechend vermindert sein müsste. Es wurde hierbei mit TetR-IE1-Fibroblasten und TetR-Fibroblasten als Kontrollzellen

gearbeitet. Diese wurden mit zwei unterschiedlichen siRNAs, welche beide einen Abbau von IFN γ -Rezeptor-mRNA bewirken, transfiziert.

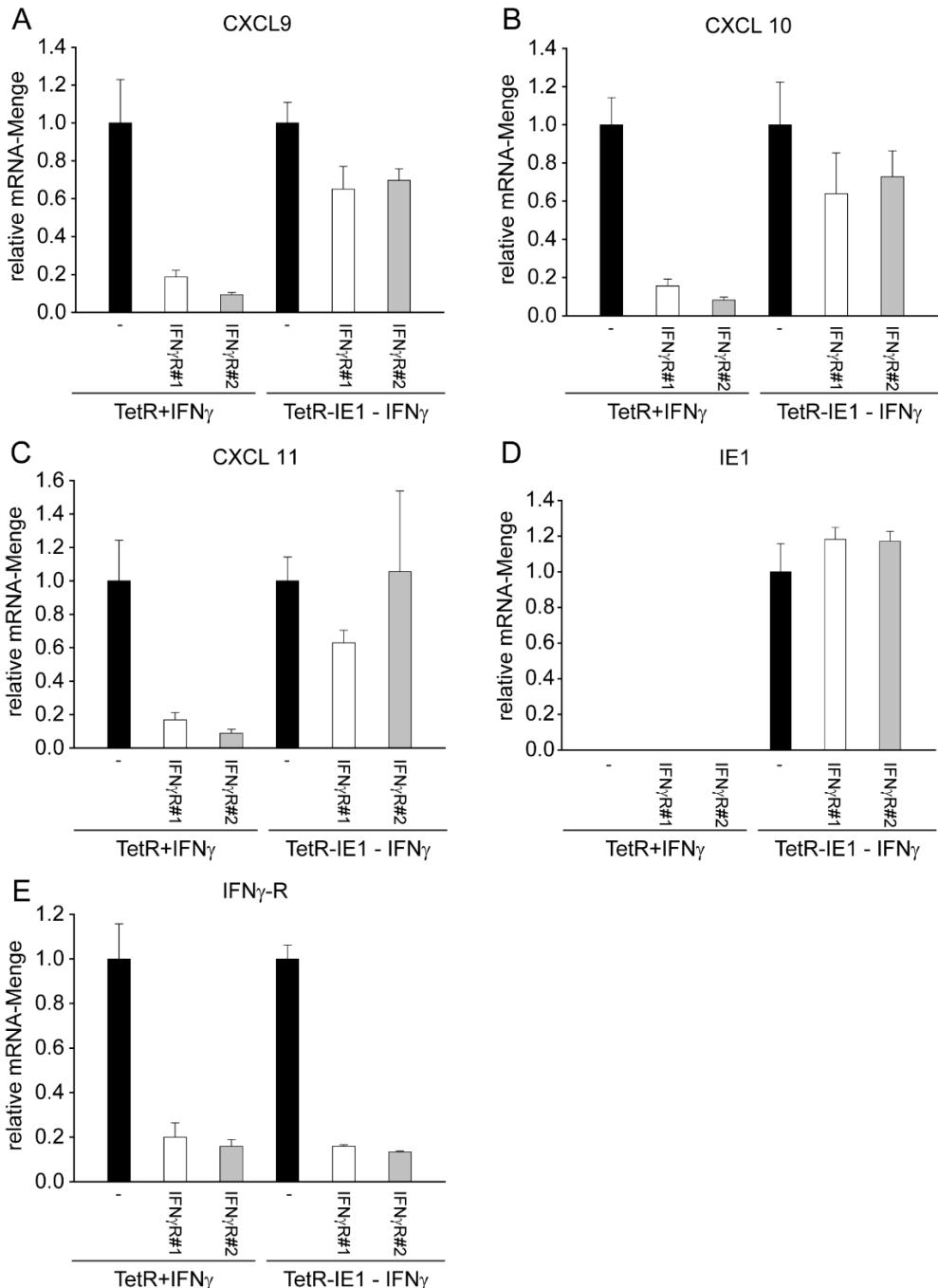


Abbildung 18: Der IFN γ -Rezeptor Knockdown zeigt nur einen geringen Einfluss auf die IE1-vermittelte Aktivierung humaner Gene in der RT-qPCR-Analyse

TetR- und TetR-IE1-Zellen wurden mit siRNAs für den IFN γ -Rezeptor Knockdown oder einer Negativkontrolle transfiziert. Ab Tag 2 nach siRNA-Transfektion erfolgte für 72 h die Behandlung mit Doxycyclin (1 μ g/ml). Für die letzten 24 h wurde zu den Kulturen IFN γ (10 ng/ml) oder Lösungsmittel (-)

gegeben. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relative mRNA-Menge der angegebenen Gene mittels RT-qPCR bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Diese wurden auf Tubulin normiert.

Außerdem wurde eine Negativkontrolle mit einer wirkungslosen siRNA mitgeführt. Zwei Tage nach der siRNA-Transfektion (s. B.2.3.6.3, S. 37) wurden die Zellen wieder für 72 h mit Doxycyclin (1 µg/ml) behandelt. Um die Effekte des Knockdowns zu überprüfen, wurde außerdem in den letzten 24 h vor Zellernte IFN γ (10 ng/ml) oder ein Lösungsmittel in die Zellkulturen gegeben. Für die Analyse durch die RT-qPCR wurden die IFN γ -stimulierten TetR-Fibroblasten, als Kontrollen für einen erfolgreichen Knockdown, und TetR-IE1-Fibroblasten nach Lösungsmittelbehandlung verwendet. Zuerst wurde die Auswirkung der siRNA-Gabe auf die Transkriptmengen des IFN γ -Rezeptors untersucht (s. Abbildung 18 E, S.66). Hierbei zeigte sich bei beiden Zelltypen ein Abfall der mRNA-Mengen um etwa 80% im Vergleich zu den Lösungsmittel-behandelten Kontrollen. Somit kann von einem funktionierenden Knockdown bei beiden eingesetzten siRNAs gesprochen werden. Die Analyse der IE1-mRNA-Menge (s. Abbildung 18 D, S.66) zeigte erwartungsgemäß in den TetR-IE1-Zellen ein gleichmäßig hohes Niveau, während in den TetR-Zellen keine IE1-mRNA nachweisbar war. Als Vertreter der ISGs wurde die Chemokingruppe der CXCR3-abhängigen Gene (CXCL9, CXCL10, CXCL11) untersucht. Bei allen drei Genen zeigte sich bei den TetR-Fibroblasten ein Rückgang der Chemokin-mRNA um über 80% in den siRNA behandelten Proben, analog zu dem Bild der IFN γ -Rezeptor mRNA-Analyse. Bei den TetR-IE1-Zellen waren die mRNA-Werte von CXCL9 und CXCL10 im Vergleich zu der Lösungsmittel-behandelten Kontrolle bei etwa 60%, von CXCL11 für siRNA 1 auch bei etwa 60% und für siRNA 2 etwas über dem Niveau der Lösungsmittelbehandlung. Da hier aber der Fehler relativ groß war, kann man davon ausgehen, dass es auch etwa im Bereich von 60% bis 70% der Lösungsmittelbehandlung lag. Aus der Gesamtschau kann postuliert werden, dass unter dem Einfluss des IFN γ -Rezeptor Knockdowns eine etwas schwächere Aktivierung von ISGs durch IE1 stattfindet, nichtsdestotrotz ist der Einfluss bei einer Verminderung um etwa 30% bis 40% eher als gering einzustufen.

C.2.11. Sekretom aus induzierten TetR-IE1-Zellen fördert die Infektion von MRC5 mit klinischem hCMV-Isolat

Dass IE1-Einfluss auf die Aktivierung von ISGs besitzt, wurde bereits in den vorhergehenden Versuchen deutlich, mögliche Ursachen werden an anderer Stelle diskutiert (s. D.2, S. 83). Etwas globaler betrachtet stellt sich aber auch die Frage, ob IE1-exprimierende Fibroblasten neben einer Aktivierung von ISGs noch andere Prozesse in Gang setzen, die umliegende uninfizierte Zellen permissiver für hCMV machen. Um einen Eindruck davon zu bekommen, welche Rolle hierbei sezernierte Stoffe spielen, wurde der Kulturüberstand von IE1-exprimierenden Fibroblasten, und TetR-Puro Fibroblasten als Kontrolle, 72 h nach Induktionsbeginn gesammelt. Anschließend wurden jeweils drei 96-well-Platten unbehandelter MRC5-Fibroblasten ausgesät und das Medium nach 7 Tagen durch das vorher gesammelte konditionierte Kulturmedium ausgetauscht. Nach weiteren 2 Tagen in diesem, wurden die Zellen mit einem laboradaptierten Towne-Stamm (s. B.1.5.3, S. 19) infiziert.

Verdünnung	Überstände aus TetR-IE1-Zellen			Überstände aus TetR-Puro-Zellen		
	A	B	C	A	B	C
10 ⁻²	7	8	6	0	2	0
10 ⁻³	5	1	0	0	2	0
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0

Abbildung 19: Einfluss des Sekretoms von induzierten TetR-IE1-Zellen auf eine Infektion mit einem TN-Virusstamm (Plaquebildung)

7 Tage nach Aussaat der MRC5-Zellen auf 96-well-Platten (A, B, C) erfolgte ein Medienwechsel mit vorher konditioniertem Medium aus Überständen von induzierten TetR-IE1- und TetR-Puro-Zellen. Die Zellen wurden für 2 Tage in diesem Medium inkubiert, bevor sie mit einem laboradaptierten TN-Virusstamm infiziert wurden. 2 Tage post infectionem wurde das Kulturmedium durch konditioniertes Medium ausgetauscht. 13 Tage post infectionem wurden die Platten mit einem Zeiss Axiovert 200-Mikroskop untersucht und die bis dahin bestehenden infizierten Zellplaques ausgezählt.

Dies erfolgte in logarhythmischer Verdünnung (beginnend von 10⁻² bis 10⁻⁸) ausgehend von einem Virusstock mit 1x10⁶ PFU/ml. Zwei Tage nach dieser Infektion wurde das Medium

noch einmal durch konditioniertes Medium ersetzt, 13 Tage später erfolgte die mikroskopische Auswertung, wobei fluoreszierende Zellplaques als Zeichen einer positiven Infektion gewertet wurden. Bei dem Vergleich der Anzahl positiv infizierter wells von TetR-IE1-behandelten und TetR-Puro-behandelten Fibroblasten zeigte sich bei einer Infektion mit 10^{-2} Viren/Zelle auf allen drei TetR-IE1-Medium-Platten positive Zellplaques (s. Abbildung 19, S. 68). Dagegen fand sich bei den TetR-Puro-Medium-Platten nur eine positive 96-well-Platte, bei der auch deutlich weniger wells positiv waren. Bei einer Infektion mit 10^{-3} Viren/Zelle waren immer noch zwei Platten mit TetR-IE1-Überständen positiv, bei den TetR-Puro-Überständen nur eine Platte. Eine weitere 1:10 Verdünnungsstufe erbrachte bei beiden keine positiven Plaques mehr. Somit ist ersichtlich, dass das Sekretom von TetR-IE1-Zellen einen förderlichen Einfluss auf die Infektion von MRC5-Fibroblasten mit einem hCMV-Isolat hat. Welche Faktoren und Prozesse hierfür verantwortlich gemacht werden können, muss an anderer Stelle noch abgeklärt werden.

C.2.12. Zusammenfassung

Die bisherigen Ergebnisse bestätigten, dass IE1 in humanen Fibroblasten unter anderem eine Aktivierung von ISG verursachte, welche IFN γ -ähnlich war. Bei genauerer Untersuchung zeigte sich eine vermehrte Transkription der CXCR3-Liganden Gene mit einer maximalen mRNA-Menge am Tag 10 der IE1-Expression. Eine IE1-Präexpression in humanen Fibroblasten hat nur einen geringen synergistischen Effekt auf die Expressionsaktivierung von ISGs durch IFN γ . Es ließen sich keine verstärkten synergistischen Effekte in Abhängigkeit von der IFN γ -Konzentration bzw. dem Zeitpunkt der IFN γ -Gabe feststellen. Die größte Menge an ISG-Transkript war 12 h nach der IFN γ -Gabe nachweisbar. Zudem waren IFN nicht an einer IE1-vermittelten ISG-Aktivierung beteiligt, der IFN γ -Rezeptor spielte hierbei ebenfalls eine untergeordnete Rolle. Das Sekretom IE1-exprimierender MRC5-Zellen zeigte einen förderlichen Einfluss auf die Infektion nativer MRC5 mit einem hCMV-Isolat. Welche Teile des Sekretoms hierfür verantwortlich sind, muss noch weiter geklärt werden.

C.3. Untersuchung der IE1-Antwort in humanen Endothelzellen und ihre Auswirkung auf die Adhäsion von Blutzellen

C.3.1. Überblick

Nachdem die IE1-abhängige Regulation der Genexpression in Fibroblasten umfassend charakterisiert worden war, stellte sich die Frage, ob menschliche Endothelzellen ein ähnliches Verhalten zeigen. Letztere stellen durch ihren Kontakt zum Blutkreislauf eine erste Barriere für die Ausbreitung einer hCMV-Infektion im Körper dar und sind daher eine relevantere Zellpopulation als Fibroblasten. Die Adhäsion zwischen Abwehrzellen und dem Endothel spielt eine wichtige Rolle bei der Verbreitung und Pathogenese von hCMV (s. D.3, S. 85). Da auch CXCR3 und seine Liganden hierbei eine Rolle spielen (Jinquan et al. 2000), sollte die Induzierbarkeit dieser Achse analog zu MRC5 überprüft und die biologische Relevanz in einem Adhäsionstest verifiziert werden. Hierfür wurden primäre HUVEC-Kulturen zuerst auf eine Verunreinigung durch Mykoplasmen überprüft (s. C.3.1, S. 70), welche die Messergebnisse erheblich beeinträchtigen könnte. Anschließend wurde untersucht, inwieweit die verwendeten Endothelzellen suszeptibel für ein klinisches hCMV-Isolat sind (s. C.3.3, S. 72). Daraufhin erfolgte eine genaue Charakterisierung der IE1-Antwort in Endothelzellen im zeitlichen Verlauf mit Hilfe von Immunfluorezenzmikroskopie, Western Blot (s. C.3.4, S. 73) und RT-qPCR (s.C.3.5, S. 75). Da IE1 erhöhte mRNA-Mengen von CXCR3-Liganden induzierte, wurde im Hinblick auf spätere Adhäsionsversuche überprüft, ob die eingesetzten Blutzellen (PBMC, KG1) über den CXCR3-Rezeptor verfügten (s. C.3.6, S. 77). Bei der Ausarbeitung des Adhäsionsprotokolls wurden TNF α und IFN γ als Positivkontrollen für Zelladhäsionsvermittlung getestet (s. C.3.7, S. 78) und schließlich der Effekt von IE1-exprimierenden HUVEC auf die Adhäsion von Blutzellen überprüft (s. C.3.8, S. 80).

C.3.2. HUVEC-Kulturen sind Mykoplasmen-frei

HUVEC wurden von der Arbeitsgruppe Hoenicka (s. B.1.5.2, S. 18) isoliert und für weitere Experimente zur Verfügung gestellt. Nach Erhalt der Zellen wurde ein Teil umgehend weiterkultiviert, während der Rest für spätere Versuche eingefroren wurde. Um mögliche Fehler durch eine Verunreinigung der Zellen durch Mykoplasmen zu vermeiden, wurden sowohl die weiterkultivierten als auch die eingefrorenen HUVEC auf Mykoplasmen untersucht. Hierbei wurde mit dem PCR Mycoplasma Test Kit II der Firma Promocell gearbeitet (s. B.2.3.3, S. 33). Bei der Auswertung der Agarosegelektrophorese ergaben sich weder bei den eingefrorenen noch bei den frischen HUVEC Anhaltspunkte für Mykoplasmen-DNA (Bande bei etwa 280 bp, Abbildung 20, S. 71). Daraus ließ sich folgern, dass die verwendeten HUVEC-Kulturen Mykoplasmen-frei waren.

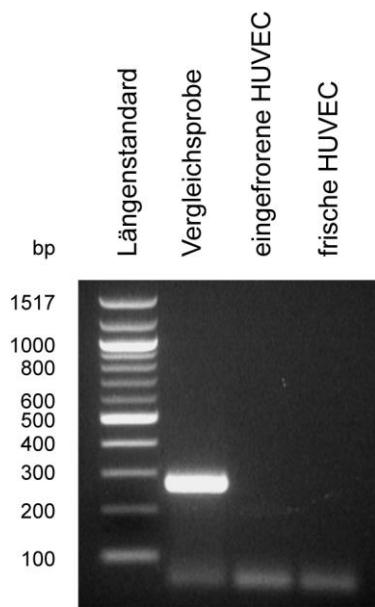


Abbildung 20: PCR zum Ausschluss einer Mykoplasmen-Verunreinigung der HUVEC-Kulturen

500 ng der amplifizierten PCR Produkte wurden zusammen mit 500 ng 100 bp Leiter (Längenstandard) in einem 2%igen mit EtBr gefärbten Agarosegel aufgetrennt und mit einer mitgelieferten Positivkontrolle (Vergleichsprobe) verglichen.

C.3.3. HUVEC sind mit klinischem hCMV-Isolat infizierbar

Da mit HUVEC bisher keine Vorerfahrungen in der Arbeitsgruppe bestanden, war der nächste Schritt eine vergleichende Infektion von HUVEC und MRC5 mit einem klinischen hCMV-Isolat (FX-Stamm), um die Suszeptibilität der Endothelzellen zu überprüfen. $6,1 \times 10^5$ Zellen wurden hierfür mit verschiedenen Verdünnungen eines EGFP exprimierenden FX-Virusstammes (s. B.1.5.3, S. 19) bei hoher MOI infiziert und 24 h später mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop untersucht. Es zeigten sich einzelne deutlich fluoreszierende Endothelzellen, die eine Infektion mit hCMV belegen (s. Abbildung 21, S. 72). Im Vergleich verlief die Virus-Ausbreitung in Fibroblasten vollständig und deutlich schneller als in Endothelzellen (welche im Beobachtungszeitraum nicht konfluent infiziert waren), was durch die Adaptation des hCMV-Isolats an Fibroblastenkulturen zu erwarten war (Murphy et al. 2003; Hahn et al. 2004). Da eine hCMV-Infektion von HUVEC offenbar möglich ist, war die Basis für weitere Versuche mit diesen Zellen gegeben.

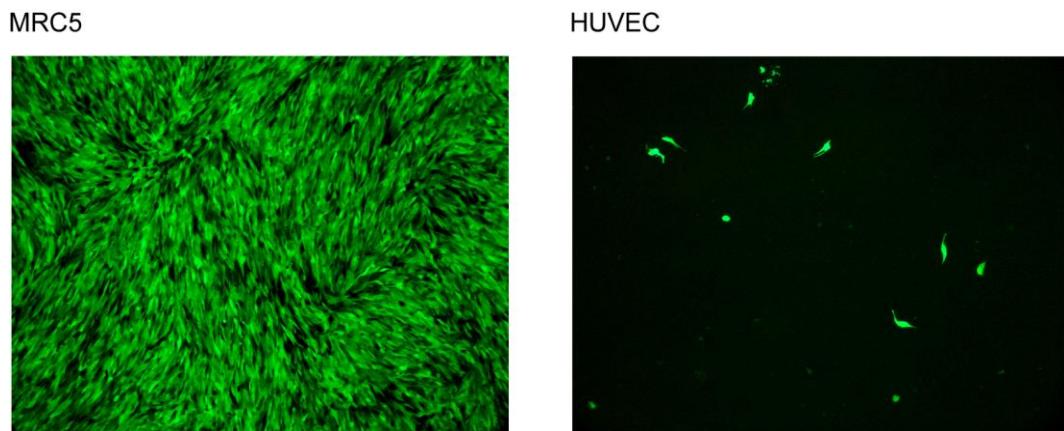


Abbildung 21: Fluoreszenzanalyse FX-infizierter MRC5 und HUVEC

Für die Infektionsanalysen wurden je $6,1 \times 10^5$ Zellen der beiden Zelltypen mit verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:3, 1:9) des hCMV-FX-Stamms (EGFP-positiv) infiziert oder ohne Virus entsprechend behandelt. Die vorliegenden Bilder stammen von den mit unverdünnten Virus-Präparationen versetzten Zellkulturen. Sie wurden 24 h mit dem FX-Virus inkubiert und am vierten Tag nach Infektion mit einem Zeiss Axiovert 200-Mikroskop untersucht und bei 100-facher Vergrößerung fotografiert.

C.3.4. Herstellung und Charakterisierung von TetR-IE1-HUVEC

HUVEC wurden nach dem bereits für Fibroblasten etablierten Protokoll (s. B.2.3.6.2, S. 36) transduziert. In einer IE1-Lentivirus-Verdünnungsreihe bei Transduktion zeigte sich eine maximal induzierbare ISG-Antwort bei der Verwendung unverdünnter Lentiviruspräparationen (Daten nicht gezeigt). Der nächste Schritt war die weitere Charakterisierung der hergestellten TetR-IE1-HUVEC im Hinblick auf die Kinetik der IE1-Mengen nach Beginn der Induktion. Dies wurde zum einen mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, zum anderen im Western Blot-Verfahren quantifiziert. Ausgewertet wurden hierbei TetR-IE1-HUVEC, welche uninduziert blieben oder zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion mit Doxycyclin (1 µg/ml) geerntet (s. B.2.2.1, S. 26; B.2.2.2, S. 27) bzw. fixiert (s. B.2.2.3, S. 28) worden waren.

In der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde mit DAPI die DNA aller vorhandenen Zellkerne sichtbar gemacht (blau), in grün erscheint der Tet-Repressor, da dieser mit EGFP gekoppelt ist (s. Abbildung 22 A, S. 74). Im roten Farbkanal ist das IE1-Protein bzw. dessen Lokalisation zu erkennen und das „Merge“-Bild zeigt eine Überlagerung aller Farbsignale. Um die Beispielbilder noch weiter zu objektivieren, wurden außerdem für jeden Zeitpunkt etwa 400 Kerne ausgezählt und der relative Anteil der nicht (-) leicht (+) oder stark (++) positiv gefärbten Kerne in der IE1-Färbung bestimmt. Betrachtete man die Zellen im uninduzierten Zustand, war zu erkennen, dass alle Zellkerne, die mit DAPI angefärbt worden waren auch im grünen Farbkanal sichtbar sind. Somit konnte man davon ausgehen, dass der Tet-Repressor gleichmäßig in allen Zellen exprimiert wird. Einen Rückschluss auf seine Funktionsfähigkeit gab der Vergleich zwischen den TetR- und IE1-gefärbten Zellkernen. Hier sah man, dass es zwar häufig zu einer schwachen IE1-Färbung kommt, aber nur sehr wenige Kerne (1,39%) in größerem Umfang IE1 exprimieren. 6 h nach Aktivierung zeigte sich schon ein anderes Bild. Die Tet-Repressor Verteilung war wieder vergleichbar, allerdings stieg die Zahl der deutlich IE1-gefärbten Zellkerne auf knapp 80%. Betrachtete man das Bild nach 12 h und 24 h, so war hier die Verteilung von IE1 in den Zellkernen schon sehr homogen und erreichte über 95% der Zellen. Nach 48 h und 72 h

zeigte sich in der Immunfluoreszenz keine große Veränderung mehr, über 99% der ausgezählten Zellkerne waren hier deutlich IE1-positiv.

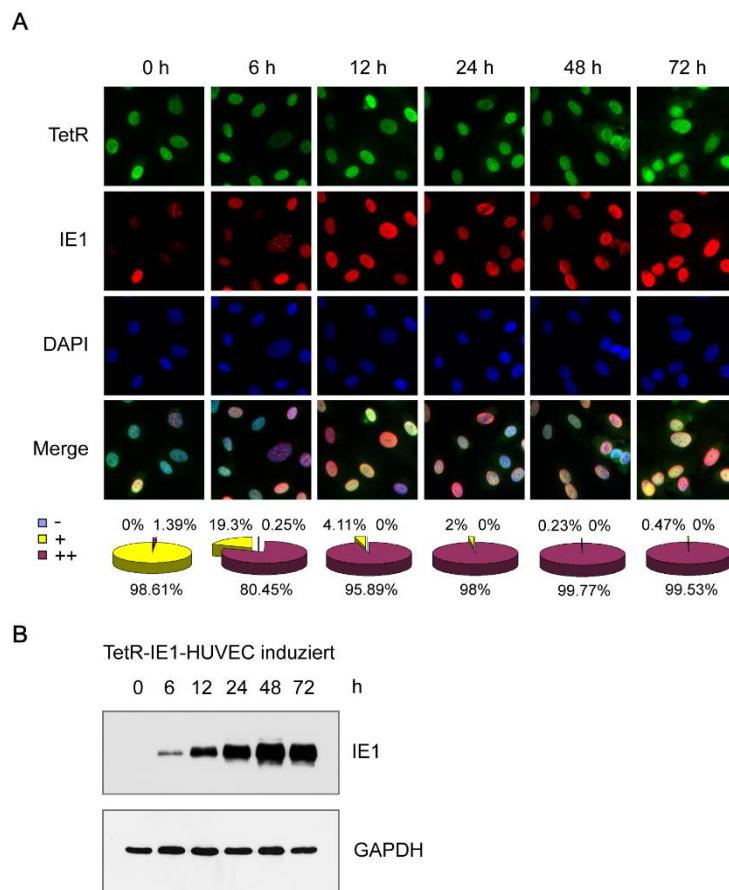


Abbildung 22: Charakterisierung der TetR-IE1-HUVEC durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot

(A) Wachstumsarretierte TetR-IE1-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) mit Doxycyclin behandelt (1 µg/ml) oder unbehandelt gelassen. Nach Methanol-Fixierung wurde eine Markierung durch Antikörper gegen IE1 (rot) bzw. mittels DAPI für DNA (blau) durchgeführt. TetR-positive Zellen leuchten aufgrund der EGFP-vermittelten Autofluoreszenz. Es erfolgte eine Auszählung von etwa 400 zufällig ausgewählten Zellkernen pro Zeitpunkt nach folgendem System: -, keine erkennbare IE1-Färbung; +, schwache, gepunktete IE1-Färbung; ++, starke, diffuse IE1-Färbung. (B) Mit Doxycyclin behandelte TetR-IE1-Zellen wurden im Western Blot-Verfahren mit IE1- bzw. GAPDH-spezifischen Antikörpern (s. B.1.1., S. 15) analysiert.

Zur genaueren Charakterisierung der IE1-Kinetik auf Proteinebene wurde als zweite Methode eine Western Blot-Analyse durchgeführt (s. Abbildung 22, S. 74). Hierbei wurde zur Erfassung der IE1-Kinetik in TetR-IE1-HUVEC ein GAPDH-Antikörper als

Ladekontrolle verwendet. Erwartungsgemäß fand vor Beginn der Induktion noch keine nachweisbare IE1-Produktion in den Zellen statt. Ab 6 h war eine erste Bande mit IE1-Protein nachweisbar. Diese vergrößert sich stetig bis zum 72 h Zeitpunkt.

Beide Analysen zeigen, dass die erzeugten TetR-IE1-HUVEC im uninduzierten Zustand kaum IE1 produzieren. Nach einer Induktion ist schon nach 6 h eine IE1-Produktion nachweisbar, welche sich bis 72 h weiter verstärkt.

C.3.5. Nachweis einer Typ II IFN-ähnlichen Antwort nach IE1-Expression in HUVEC

Nachdem im ersten Schritt der Charakterisierung der TetR-IE1-HUVEC der Nachweis für eine induzierbare IE1-Produktion erbracht werden konnte (s. C.3.4, S. 73), stellte sich als nächstes die Frage nach der Wirkung von IE1 auf die Genexpression in den Endothelzellen. Hierfür wurden TetR-IE1-HUVEC und TetR-Puro-HUVEC als Kontrollzellen für 96 h mit Doxycyclin behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Anschließend erfolgte eine RNA-Isolierung (s. B.2.1.6, S. 23), cDNA-Synthese und schließlich die Auswertung durch RT-qPCR (s. B.2.1.9, S. 25). Es sind die PCR-Daten zweier CXCR3-Liganden mit den jeweiligen IE1-mRNA-Mengen aus den zugehörigen Proben abgebildet (s. Abbildung 23, S. 76). Betrachtet man zuerst die beiden Graphen der IE1-mRNA-Mengen (s. Abbildung 23 A, C, S. 76) so findet man erwartungsgemäß in den Kontrollzellen keinen Nachweis für IE1-mRNA. In den TetR-IE1-HUVEC zeigt sich vor Beginn der Induktion eine sehr niedrige Menge an IE1-mRNA, was für eine gute Suppression der Transkription durch den Tet-Repressor spricht. Nach 24 h war bereits eine deutliche Zunahme an IE1-mRNA zu verzeichnen, welche sich bis zum 96 h-Zeitpunkt fortsetzte. Die Unterschiede im Umfang der Zunahme (bis zu 20-fach bzw. bis zu 500-fach bei 96 h) erklären sich aus den unterschiedlichen Grundmengen der IE1-mRNA, da der Wert zum Zeitpunkt 0 h auf 1 gesetzt wurde. Die Untersuchung der CXCL11-mRNA zeigte, dass im uninduzierten

Zustand in den TetR-IE1-HUVEC sogar niedrigere Mengen als in den Kontrollzellen erreicht wurden (s. Abbildung 23 B, S. 76).

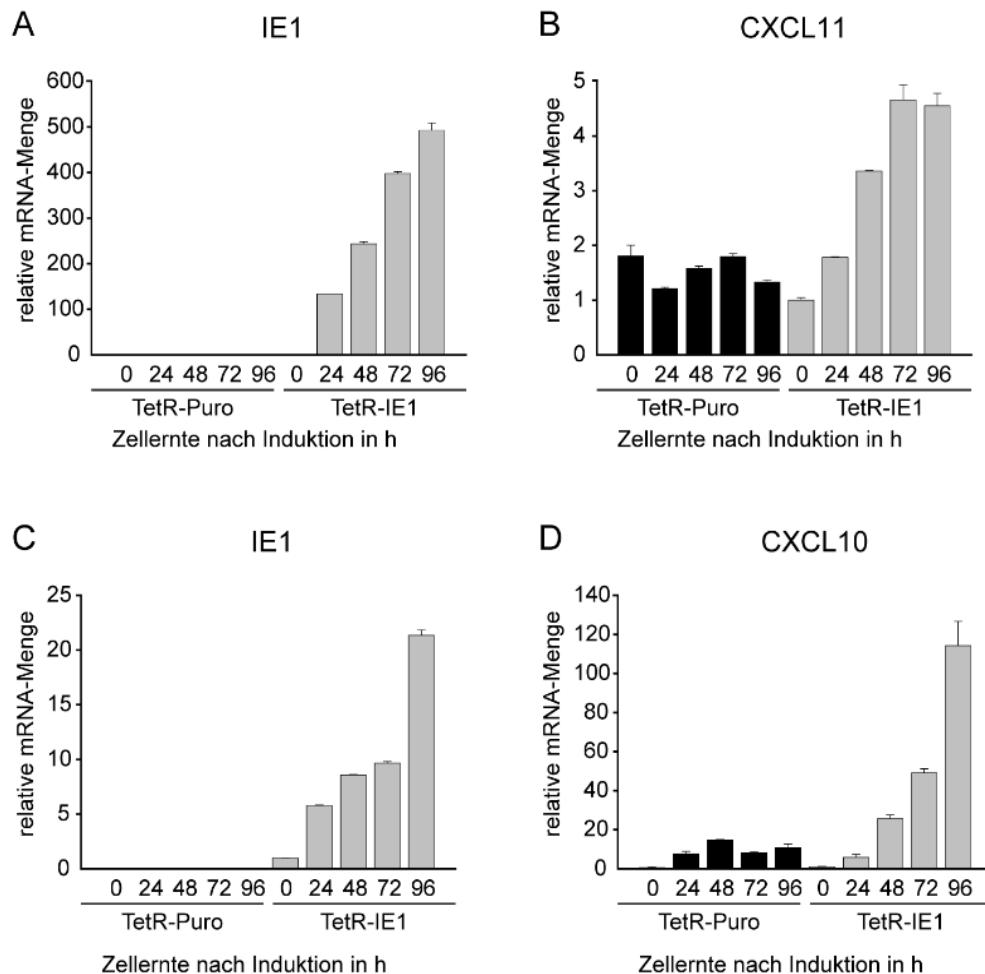


Abbildung 23: Charakterisierung der IE1-vermittelten ISG-Aktivierung in TetR-IE1-HUVEC durch RT-qPCR

TetR-Puro- und TetR-IE1-HUVEC wurden für 96 h mit Doxycyclin behandelt (A, B: 0,4 µg/ml; C, D: 1 µg/ml) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion geerntet. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relativen mRNA-Mengen der angegebenen Gene mittels RT-qPCR bestimmt. Es wurden die Mittelwerte aus je 2 biologischen und 2 technischen Replikaten mit ihrer Standardabweichung verwendet. Diese wurden auf Tubulin normiert und relativ zu den Ergebnissen in TetR-IE1-Zellen zum Zeitpunkt der Induktion (=1) aufgetragen.

Während die Werte in TetR-Puro-HUVEC im Verlauf der Induktion unspezifisch schwankten, ergab sich bei den TetR-IE1-HUVEC eine sichtbare Steigerung auf das etwa 4,5-fache des Ausgangswertes vor Induktion. Bei der Untersuchung der CXCL10-mRNA-

Mengen zeigte sich ein ähnliches Bild (s. Abbildung 23 D, S. 76). Auch hier kam es zu kleinen unspezifischen Schwankungen bei den Kontrollzellen und einem kontinuierlichen Anstieg der CXCL10-mRNA auf das etwa 110-fache des Ausgangswertes nach IE1-Induktion. Somit aktiviert IE1, wie in Fibroblasten, auch in den untersuchten HUVEC die Expression von ISG am Beispiel der CXCR3-Liganden CXCL10 und CXCL11.

C.3.6. Nachweis von CXCR3 auf KG1-Zellen und PBMC

Um in nachfolgenden Experimenten eine mögliche Interaktion von CXCR3-Liganden IE1-exprimierender HUVEC und Blutzellen zu untersuchen, war es entscheidend geeignete Zellen zu finden, welche ausreichend CXCR3-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen.

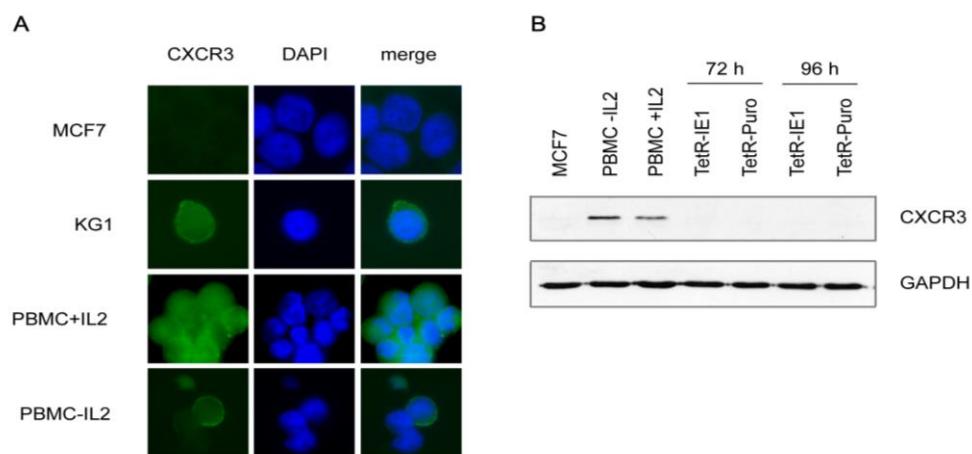


Abbildung 24: Nachweis von CXCR3-Protein auf PBMC- und KG1-Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot

(A) Die für die Adhäsionstests vorgesehenen Zellen (PBMC mit oder ohne IL2-Stimulation (s. B.2.3.2, S. 32), KG1) und Kontrollzellen (MCF7) wurden mit Methanol fixiert. Anschließend wurde eine Antikörperfärbung gegen CXCR3 (grün) und DAPI-Färbung der DNA (blau) durchgeführt. (B) Verschiedene Zellen (MCF7, PBMC mit oder ohne IL2 (s. B.2.3.2, S. 32), TetR-Puro-HUVEC/ TetR-IE1-HUVEC 72 h bzw. 96 h nach Induktion mit Doxycyclin) wurden im Western Blot-Verfahren mittels CXCR3- bzw. GAPDH-Antikörpern (s. B.1.1, S. 15) analysiert.

KG1-Zellen bieten als immortalisierte Zelllinie den Vorteil schneller Verfügbarkeit und problemloser Kultivierung über einen längeren Zeitraum. PBMC wurden verwendet, um Untersuchungsbedingungen nahe an der Situation in vivo herzustellen. Eine Kultivierung über längere Zeit war aufgrund schneller Seneszenz schwierig, weswegen sie für die Adhäsionstest zeitnah isoliert wurden (s. B.2.3.2, S. 32). Für eine verstärkte Proliferation und Differenzierung der Subpopulationen wurden die PBMCs mit IL2 stimuliert (León et al. 2013). MCF7 sollten als Positivkontrolle verwendet werden, da auf ihnen CXCR3 nachgewiesen wurde (Datta et al. 2006). Dies wurde zum einen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (s. B.2.2.3, S. 28) zum anderen mittels Western Blot-Technik (s. B.2.2.2, S. 27) analysiert. Betrachtet man die Methanol-fixierten Blutzellen (s. Abbildung 24 A, S. 77), so erkennt man die mit DAPI-angefärbten Zellkerne in blau, CXCR3-Rezeptoren sind grün detektierbar und in „Merge“ ist das überlagerte Gesamtbild dargestellt. Es zeigte sich, dass von den in der Immunfluoreszenz untersuchten Zellen sowohl die Zelllinie KG1 als auch die primären PBMC (s. B.2.3.2, S. 32), unabhängig von einer IL2-Stimulation, den CXCR3-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Bei der MCF7-Zelllinie konnte der CXCR3-Rezeptor nicht nachgewiesen werden, weswegen sie als Positivkontrolle verworfen wurde. Dies bestätigte sich auch in der Western Blot-Analyse, in der neben PBMC und MCF7 auch TetR-IE1- bzw. TetR-Puro-HUVEC untersucht wurden. Obwohl man in der Kontrolle des zellulären Haushaltsproteins GAPDH gleichmäßige Mengen erhielt, zeigte sich nur bei den PBMC eine durch den CXCR3-Rezeptor anfärbbare Bande. Eine KG1-Kontrolle wurde im Western Blot nicht mitgeführt. Als Blutzellen für die folgenden Adhäsionsexperimente kommen also PBMC und KG1-Zellen in Betracht, da sie ausreichend CXCR3-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren.

C.3.7. TNF α vermittelt im Gegensatz zu IFN γ die Adhäsion verschiedener monozytärer Zellen

Um einer möglicherweise durch IE1 verursachten Interaktion zwischen Endothel- und Blutzellen auf die Spur zu kommen, wurde im nächsten Schritt erprobt, inwieweit Zytokine

wie IFN γ oder TNF α als Positivkontrollen die Zelladhäsion beeinflussen. Hierfür wurden TetR-Puro-HUVEC für 24 h oder 72 h mit Doxycyclin (1 μ g/ml) behandelt, um eine den späteren Experimenten ähnliche Situation zu schaffen. Nach dieser Zeit wurden die Endothelzellen entweder für 6 h mit TNF α (10 ng/ml) oder IFN γ (10 ng/ml) inkubiert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden mit Hoechst 33342 markierte Blutzellen (KG1, PBMC mit oder ohne IL2-Behandlung) auf die Endothelzellen gegeben und entsprechend dem Adhäsionsprotokoll (s. B.2.3.9, S. 38) behandelt.

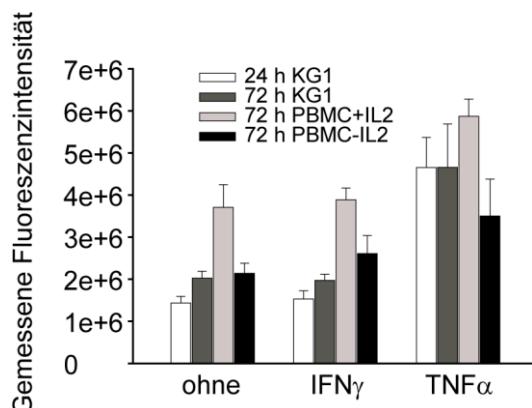


Abbildung 25: TNF α vermittelt im Gegensatz zu IFN γ die Adhäsion verschiedener monozytärer Zellen

TetR-Puro-HUVEC wurden auf einer 96-well-Platte ausgesät und am darauffolgenden Tag mit Doxycyclin (1 μ g/ml) behandelt. Entweder 24 h oder 72 h später wurden die Zellen für 6 h mit TNF α (10 ng/ml) oder IFN γ (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt belassen (ohne). Im Anschluss wurden mit Hoechst 33342 markierte Suspensionszellen (PBMC, KG1) auf die Endothelzellen gegeben. Nach dem Waschen erfolgte eine Auswertung der verbleibenden Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzreader Victor3. Es wurden jeweils 4 wells jeder Kombination gemittelt und die Standardabweichung aufgetragen.

Anschließend erfolgte eine Auswertung der verbliebenen Fluoreszenzintensität mit Hilfe des Fluoreszenzreaders Victor3. Aus den erhobenen Daten wurde ersichtlich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und IFN γ -behandelten Zellen im Hinblick auf eine vermehrte Anheftung von KG1-Zellen oder PBMC gab (s. Abbildung 25, S. 79). Bei TNF α behandelten Zellen zeigte sich allerdings eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität und fluoreszenzmikroskopisch fanden sich hier auch deutlich größere Mengen an adhärierten Zellen (Daten nicht gezeigt). So war mit TNF α ein Zytokin gefunden, das als funktionierende Positivkontrolle für weitere Adhäsionstests eingesetzt werden konnte.

C.3.8. IE1-Expression hat keinen Effekt auf die Adhäsion verschiedener monozytärer Zellen

Aus den Vorversuchen stellte sich die Frage, ob IE1 durch Aktivierung der Genexpression von CXCR3-Liganden in der Lage ist eine Adhäsion von CXCR3-positiven monozytären Zellen an IE1-exprimierende Endothelzellen zu fördern. Hierfür wurde der etablierte Ablauf für Adhäsionsexperimente (s. B.2.3.9, S. 38) verwendet. Für 24 h oder 72 h mit Doxycyclin (1 µg/ml) induzierte TetR-Puro- bzw. TetR-IE1-HUVEC wurden in Kontakt mit Hoechst 33342-markierten Blutzellen gebracht und anschließend im Fluoreszenzreader Victor3 ausgewertet. Vergleicht man die beiden Zelltypen im Hinblick auf die gemessene Fluoreszenzintensität, so muss man feststellen, dass es keinen Unterschied bei den korrespondierenden Versuchen gab.

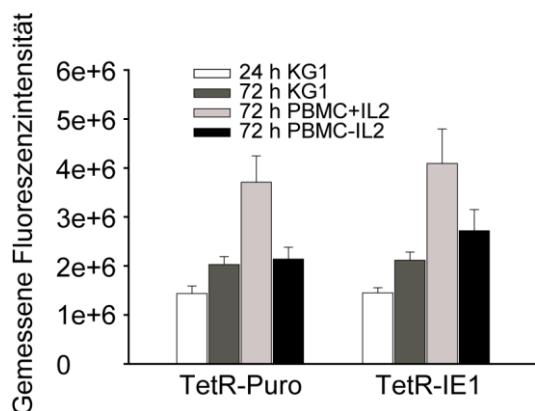


Abbildung 26: IE1-exprimierende Zellen vermitteln keine verstärkte Adhäsion von unterschiedlichen monozytären Zellen

TetR-IE1- und TetR-Puro-HUVEC wurden auf einer 96-well-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit Doxycyclin (1 µg/ml) behandelt. Im Anschluss wurden mit Hoechst 33342 markierte Suspensionszellen (PBMC, KG1) auf die Endothelzellen gegeben. Nach dem Waschen erfolgte eine Auswertung der verbleibenden Fluoreszenzintensität im Fluoreszenzreader Victor3. Es wurden jeweils 4 wells jeder Kombination gemittelt und die Standardabweichung aufgetragen.

Nach einer 72 h Doxycyclininduktion und Zugabe von PBMC, die vorher mit IL2 versetzt worden waren, ließ sich die höchste Adhäsion erreichen (s. Abbildung 26, S. 80). Allerdings überlappte auch hier der Messfehlerbereich, sodass sich kein signifikanter Unterschied

zwischen den IE1-positiven und -negativen Zelllinien feststellen ließ. Die niedrigste Fluoreszenzintensität wurde bei den Proben gemessen, die für 24 h mit Doxycyclin behandelt und anschließend mit KG1-Zellen inkubiert wurden. Auch hier ließ sich kein Unterschied zwischen TetR-Puro- und TetR-IE1-HUVEC im Hinblick auf eine verbesserte Adhäsion feststellen. Somit ließ sich anhand dieses Versuches kein Hinweis darauf finden, dass eine IE1-Expression in Endothelzellen einen verbesserten Effekt auf die Adhäsion von CXCR3-positiven monozytären Zellen hat.

C.3.9. Zusammenfassung

Die verwendeten HUVEC-Kulturen waren bei ihrer Überprüfung Mykoplasmen-frei und permissiv für eine Infektion mit einem klinischen hCMV-Isolat. Ebenso ließen sich mittels Lentivirus-Transduktion induzierbare TetR-IE1-HUVEC-Zelllinien herstellen, welche die IE1-Expression durch den Tet-Repressor wirkungsvoll unterdrückten. 6 h nach Induktionsbeginn ist IE1 bereits gut nachweisbar, und die IE1-Translation verstärkt sich auch bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt 72 h nach Beginn der Induktion. Auch in HUVEC ließ sich nach IE1-Expression eine vermehrte Aktivierung von ISG am Beispiel der CXCR3-Liganden CXCL10 und CXCL11 nachweisen. Im Hinblick auf die Adhäsionsexperimente wurde gezeigt, dass sowohl KG1-Zellen als auch PBMC ausreichend CXCR3-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Des Weiteren wurde festgestellt, dass das Zytokin TNF α als Positivkontrolle für den Adhäsionstest verwendet werden kann, IFN γ hingegen keine ausreichende Wirkung hat. Bei der Überprüfung der Adhäsion von monozytären Zellen an IE1-exprimierende HUVEC ließ sich unter den verwendeten Bedingungen kein Hinweis für eine Adhäsion der beiden Zelltypen erbringen.

D. Diskussion

D.1. Notwendigkeit eines induzierbaren Systems zur Untersuchung von IE1-Funktionen

Um die zelluläre Reaktion auf IE1 ohne die sekundären Effekte einer Virusinfektion darstellen zu können, bestand die Notwendigkeit das virale Protein außerhalb des viralen Systems zu exprimieren. Die einfachste Möglichkeit dies zu erreichen, wäre eine transiente oder stabile Transfektion mit IE1-exprimierenden Plasmiden. Diese Methode ist für die verwendeten Zielzellen (MRC5 und HUVEC) jedoch wenig geeignet, da sich diese als Primärzellen ineffizient transfizieren lassen und die Transfektionseffizienz zwischen einzelnen Zellen sehr variabel sein kann. Abhilfe schafft hier ein lentiviraler Vektor, der die IE1-kodierende Sequenz in das zelluläre Genom integriert. Sowohl nach Plasmidtransfektion als auch nach Lentivirusinfektion reagiert die Zelle jedoch zu Beginn mit einer Stressantwort, welche auch eine ISG-Aktivierung beinhalten kann. Eine solche stressbedingte ISG-Aktivierung würde die IE1-vermittelte IFN-Antwort initial überlagern. Bis die Stressreaktion abklingt, würden die Zellen sich dagegen möglicherweise an die IE1-Effekte anpassen und/oder seneszent und damit unbrauchbar werden. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass sich eine kontinuierliche IE1-Expression nicht mit normaler Zellproliferation und genomicscher Integrität vereinbaren lässt (Castillo et al. 2005; Cobbs et al. 2008; Shen et al. 1997), was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden konnte (abgekugelte, apoptotische Zellen nach IE1-Transduktion, Versuchsdaten nicht dargestellt). Somit gibt es verschiedene Gründe, die für ein System mit induzierbarer IE1-Expression sprechen. Ein Vorteil der Lentiviren ist dabei die hohe Transduktionseffizienz (bis zu 100%) bei dem Einsatz hochtitriger Lentiviruspräparationen. Diese ließen sich durch Ultrazentrifugation weiter aufkonzentrieren (s. C.1.7, S. 49), wohingegen eine beschriebene Zentrifugation während der Lentivirustransduktion (Biagi et al. 2001) keine verbesserte Transduktionseffizienz brachte (s. C.1.8, S. 51). Das aufwändige FACS-basierte Sortieren von Zellen mit starker TetR-Expression (Knoblauch 2010) wurde überflüssig, da 293T-Zellen

im Vergleich zu den vorher verwendeten H1299-Zellen (Knoblauch 2010) effektiver Lentiviren produzierten (s. C.1.6, S. 48). Durch die Optimierung der Lentivirusproduktion und Transduktionsbedingungen war also die effektive Etablierung eines induzierbaren IE1-Expressionssystems gelungen.

D.2. Mögliche Mechanismen der IE1-vermittelten ISG-Induktion

Es ist bisher noch weitgehend unklar, auf welche Weise IE1 die Aktivierung der ISG-Transkription vermittelt. Vorstellbar wäre eine direkte Aktivierung der Promotoren durch IE1, aber auch IE1-vermittelte Interaktionen mit anderen Signalwegen und Transkriptionsaktivatoren können indirekt zur ISG-Expression führen. Gegen eine direkte Aktivierung der Gene spricht unter anderem die Beobachtung, dass die relative Menge der ISG-mRNA nach IE1-Induktion relativ langsam steigt und ihr Maximum erst 10 Tage nach Beginn der Induktion erreicht (s. C.2.5, S. 57). Diese verzögerte Aktivierung ist am plausibelsten durch einen zwei- bzw. mehrphasigen Mechanismus zu erklären. Es gibt Hinweise darauf, dass ein löslicher Faktor hierbei eine Rolle spielt (Knoblauch 2010), allerdings konnte dieser bis jetzt noch nicht identifiziert werden. Naheliegend wäre die Beteiligung von IFN oder anderen Zytokinen, welche durch IE1-exprimierende Zellen produziert werden und auto- oder parakrin eine ISG-Antwort verursachen. Mittels IFN-neutralisierender Antikörper konnte aber eine Beteiligung von IFN β und IFN γ ausgeschlossen werden (s. C.2.9, S. 64). Des Weiteren wird IFN γ typischerweise von Immunzellen und nicht von Fibroblasten oder Endothelzellen produziert (Schroder et al. 2004), was diese Möglichkeit der Aktivierung noch unwahrscheinlicher macht. IFN γ kommt als löslicher Faktor somit wohl nicht in Frage, allerdings besteht grundsätzlich die Möglichkeit einer IFN γ -unabhängigen IFN-Rezeptor-vermittelten ISG-Aktivierung, zum Beispiel durch den postulierten löslichen Faktor. Mit Hilfe eines siRNA-Knockdowns des IFN γ -Rezeptors zeigte sich, dass dieser einen geringen Einfluss auf die ISG-Aktivierung nach IE1-Expression besitzt und diese Antwort damit bei weitem nicht vollständig erklären kann (s. C.2.10, S. 65). Interaktionen von IE1 mit der JAK-STAT-Kaskade, dem klassischen Signalweg von IFN, wurden bereits beschrieben. Hierbei

zeigte sich, dass IE1 die Typ I IFN-Antwort inhibiert, indem es in den Kernen infizierter Zellen mit STAT1 und STAT2 interagiert und somit eine Assoziation des ISGF3-Komplexes mit den Typ I ISG-Promotoren verhindert (Paulus et al. 2006; Huh et al. 2008). Die IE1-vermittelte Genexpression erfordert aber auch Teile des IFN-Signalwegs, wie die Janus Kinase 1 und die aktivierte Form von STAT1, das nach IE1-Expression im Zellkern akkumuliert und mit Typ II ISG-Promotoren assoziiert (Knoblauch et al. 2011). Die komplexe JAK-STAT-Signalkaskade und mögliche Interaktionen mit IE1 werden zukünftig auch Ziel weiterer Untersuchungen sein, bis die funktionelle Bedeutung schlussendlich geklärt werden kann. Hierbei sind auch biologische Prozesse, wie Interaktionen zwischen verschiedenen zellulären Signalwegen („crosstalk“) zu berücksichtigen. Mit dem Ausschluss von IFN γ als beteiligtem löslichem Faktor konnte im Rahmen dieser Arbeit ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der mechanistischen Grundlagen der IE1-abhängigen ISG-Aktivierung geleistet werden (s. Abbildung 27, S. 84).

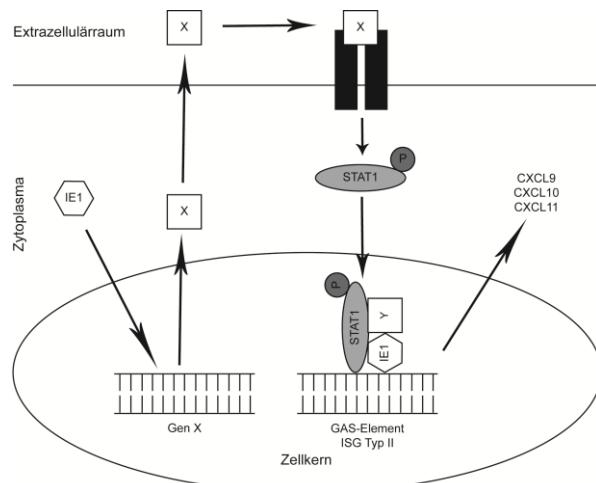


Abbildung 27: Modell zum Mechanismus der IE1-abhängigen ISG-Aktivierung

In der ersten Phase stimuliert IE1 die Produktion und Sekretion eines löslichen Faktors X. Dieser bindet in der zweiten Phase an seinen Rezeptor, über den vermutlich STAT1 phosphoryliert und damit aktiviert wird. IFN γ oder dessen Rezeptor kommen hierfür primär nicht in Frage. Ein möglicher Komplex zwischen STAT1, IE1 und unbekannten weiteren Faktoren (Y) könnte im Zellkern schließlich an GAS-Elemente binden und IFN γ -regulierte Gene (Typ II ISG), z.B. CXCL9-11 aktivieren.

D.3. Das Zusammenspiel von HUVEC und CXCR3 bei der hCMV-Pathogenese

D.3.1. Rolle von Endothelzellen bei der hCMV-Infektion

Endothelzellen trennen im menschlichen Körper den Intravasalraum von den tieferen Wandschichten der Blutgefäße. Ihnen kommt eine Schlüsselrolle bei der Diffusionskontrolle, Regulation der Blutgerinnung und Gefäßweitstellung, sowie in immunologischen Prozessen durch eine Vermittlung von Adhäsion und Leukozytenmigration zu (Lüllmann-Rauch 2006). Die erste erfolgreiche in vitro hCMV-Infektion wurde mit HUVEC durchgeführt, die seither als Standard Endothelzellkultur gelten und auch in dieser Arbeit verwendet wurden (Ho et al. 1984). Mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen verschiedenster Organe sind suszeptibel für eine produktive lytische Infektion mit hCMV, wobei sie damit sowohl zu einer weiteren hämatogenen Aussaat als auch zur Infektion von benachbarten Geweben beitragen (Sinzger C. 2008; Adler und Sinzger 2009). Dies findet unter anderem auch bei der Migration von Leukozyten durch infizierte Endothelzellen statt (Grundy et al. 1998; Waldman et al. 1995). Weiterhin wurde beobachtet, dass sich infizierte Endothelzellen aus der Gefäßwand lösen können und als „circulating cytomegalic infected cells (CCIC)“ in der Lage sind eine hCMV-Infektion im Körper zu verbreiten (Grefte et al. 1993a; Grefte et al. 1993b). Dieser Übertragungsweg könnte auch eine entscheidende Rolle bei intrauterinen hCMV-Infektionen *in vivo* spielen (Maidji et al. 2002). Die Untersuchung von seropositiven gesunden Individuen auf hCMV-DNA und Antigen zeigte, dass in vielen Fällen hCMV in Endothelzellen nachgewiesen werden kann und diese Zellen so ein potentielles Reservoir für die Latenz von hCMV bilden (Hendrix et al. 1989; Jarvis und Nelson 2007). Es ist jedoch unklar, wie groß der Beitrag von Endothelzellen zur hCMV-Latenz ist (Reeves et al. 2004). Aufgrund der funktionellen Vielfalt von Endothelzellen im menschlichen Körper ist eine unterschiedliche Suszeptibilität für hCMV vorstellbar (Fish et al. 1998; Adler und Sinzger 2009). Durch ihre physiologische Funktion und den Einfluss der hCMV-Infektion auf die Endothelpermeabilität (Bentz et al. 2006), Adhäsion von Leukozyten (Caposio et al. 2007) und

Entstehung einer proinflammatorischen Umgebung (Streblow et al. 2008) tragen Endothelzellen in besonderer Weise zu der hCMV-Pathogenese bei.

D.3.2. Bedeutung der CXCR3-Achse für hCMV-Infektion und Zelladhäsion

Die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 stellen eine Gruppe von IE1-induzierbaren proinflammatorischen Proteinen dar, die an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt sind. Alle drei Proteine werden in verschiedenen Zelltypen nach IE1-Expression (Knoblauch et al. 2011) oder hCMV-Infektion exprimiert und sind Bestandteile des hCMV-Sekretoms (Cheeran et al. 2003; Caposio et al. 2007; Rennison et al. 2009). Durch die Bindung an CXCR3 erzeugen die drei Chemokine eine chemotaktische Bewegung zirkulierender Leukozyten, besonders CD8+ T-Zellen, an den Ort der Entzündung bzw. Infektion (Lacotte et al. 2009). Neben der Expression auf aktivierten TH1-Zellen, wird CXCR3 auch auf CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Jinquan et al. 2000), welche vermutlich ein präferenter Ort für die hCMV-Latenz sind (Goodrum et al. 2002). Im Mausmodel konnte nach mCMV-Infektion bereits eine CXCR3-abhängige Rekrutierung von Immunzellen in die Leber belegt werden (Hokeness et al. 2007). Hierbei spielt die CXCR3-Achse sowohl bei der Chemotaxis, als auch bei der Adhäsionsvermittlung von aktivierten Immunzellen eine wichtige Rolle (Piali et al. 1998; Jinquan et al. 2000; Curbishley et al. 2005; Dander et al. 2008). Eine messbare Adhäsion von Immunzellen ließ sich nur an den TNF α behandelten HUVEC nachweisen (s. C.3.7, S. 78, C.3.8, S. 80). Möglicherweise liegt eine unterschiedlich starke Expression von Adhäsionsrezeptoren durch TNF α oder IFN γ zugrunde, welche verschiedene belastbare Bindungen vermittelt. Eine schwächere Adhäsion könnte durch den Scherstress (Schütteln der Platten) und die anschließende Sedimentation gelöst und somit nicht detektiert worden sein. Die eingesetzten Immunzellen (KG1, PBMC) exprimieren den CXCR3-Rezeptor (s. C.3.6, S. 77), jedoch könnte die CXCR3-Rezeptordichte für eine messbare Adhäsionsvermittlung unter den Versuchsbedingungen zu gering gewesen sein. Die Konzentration der im Zellmedium vorliegenden CXC-Liganden spielt ebenso eine wichtige Rolle. Deren Transkription nach IE1-Expression konnte zwar nachgewiesen

werden (s. C.3.5, S. 75), allerdings ist es möglich, dass die Konzentrationen der Chemokine im Medium nach Induktion durch IFN γ oder IE1 nicht ausreichend hoch waren. Eine entsprechende Optimierung des etablierten Adhäsionstests könnte für eine höhere Sensitivität sorgen und mögliche Einflüsse von IE1 auf die CXCR3-vermittelter Adhäsion nachweisen.

D.3.3. CXCR3 und die hCMV-Pathogenese in der Klinik

CXCR3 und seine Liganden werden bei einer Vielzahl unterschiedlicher entzündlicher oder autoimmuner Erkrankungen im menschlichen Körper nachgewiesen. Gerade bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen treten erhöhte Mengen an CXCR3-positiven Entzündungszellen und den Chemokinen CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (Melter et al. 2001; Goddard et al. 2001; Zhao et al. 2002; Fahmy et al. 2003) auf. Bei allogenen Nierentransplantationen kann die Bestimmung von CXCL9 und CXCL10 im Urin eine elegante Methode der nichtinvasiven Diagnostik einer Transplantatabstoßung und individuellen Therapieeinstellung sein (Jackson et al. 2011). CXCL10 wäre auch in der Frühphase nach einer Herztransplantation ein möglicher Biomarker für eine Abstoßungsreaktion (Crescioli et al. 2009). Diese erhöhte Produktion von Chemokinen kann mit hCMV assoziiert sein (Streblow et al. 2003; Weseslindtner et al. 2011) und liefert eine Erklärungsmöglichkeit für den schon länger bekannten Zusammenhang zwischen hCMV und Abstoßungsreaktionen und/oder Vaskulopathien nach Herztransplantationen (Koskinen et al. 1999). Auch subklinische hCMV-Infektionen können zu Gefäßerkrankungen und Transplantatabstoßungen führen, sodass es sinnvoll ist eine möglichst effektive Reduktion der hCMV-Viruslast zu erreichen (Potena et al. 2006; Smith et al. 2010). Durch hCMV aktivierte T-Zellen können über die CXCR3-Achse mit dem Endothel interagieren und so, in Abwesenheit einer lytischen Infektion, zu Endothelschäden führen (Bolovan-Fritts et al. 2007; van de Berg et al. 2012). Dies könnte eine Erklärung für die Pathogenese arteriosklerotischer Veränderungen bei hCMV-Infektion sein, welche weiterhin umstritten ist (Britt 2008). Eine Unterbrechung der durch CXCR3 vermittelten

Migration von Immunzellen durch Antikörpergabe zeigte im Mausmodel eine niedrigere Rate an Transplantatabstossungen (Rosenblum et al. 2009). Eine Einwanderung von T-Zellen kann allerdings im Rahmen einer hCMV-spezifischen Immuntherapie gewünscht sein. Im Bereich von Stammzelltransplantationen ist dies eine Möglichkeit Virostatika-resistente hCMV-Stämme bei Immunsupprimierten einzudämmen, ohne eine zu starke Graft-versus-Host-Erkrankung hervorzurufen (Walter et al. 1995; Peggs et al. 2003; Einsele et al. 2008; Bao et al. 2012). Auch im Rahmen von möglicherweise hCMV assoziierten Tumorerkrankungen, wie dem Glioblastom, bietet eine hCMV-spezifische Immuntherapie die Möglichkeit der adjuvanten Tumortherapie (Ghazi et al. 2012). Durch ein verbessertes Verständnis der Interaktion von hCMV, der CXCR3-Achse und den beteiligten Immun- und Endothelzellen bieten sich für die Zukunft viele Möglichkeiten, mit hCMV assoziierte Erkrankungen selektiver und effektiver zu therapieren.

E. Anhang

E.1. Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Aquired immun deficiency syndrom	h	Stunde
BSA	Bovines Serumalbumin	H1299	Humane Lungenkarzinomzelllinie
Bp	Basenpaare	hCMV	Humanes Cytomegalievirus
Bid	Zweifach destilliert	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
°C	Grad Celsius	HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
C	Konzentration	HRP	Horseradish peroxidase
cDNA	Complementary DNA	IE1	Immediate early 1
CXCL	Chemokine (C-X-C-motif) ligand	IE2	Immediate early 2
d.h.	Das heißtt	IF	Immunfluoreszenz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	IFN	Interferon
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IgG	Immunglobulin G
DTT	Dithiothreitol	IL	Interleukin
E. coli	Escherichia coli	ISG	IFN-stimulated gene
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure	ISGF	IFN-stimulated gene factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	IRF	IFN regulatory factor
EtBr	Ethidiumbromid	IR _L	Internal repeat long
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchfluszytometrie	IR _S	Internal repeat short
		ISRE	IFN-stimulated response element
FBS	Foetal bovine serum	JAK	Janus Kinase
FKS	Fötale Kälberserum	kb	Kilobasen
fw	forward	kbp	Kilobasenpaare
FX	hCMV-FIX (fusion inducin factor x)- Stamm	kDa	Kilo Dalton
		L	Liter
G	Erdbeschleunigung = 9,81 m/s ²	LTR	long terminal repeat
Gag	Gruppenspezifisches Antigen	M	Molar = Mol/l
GAS	IFN γ activated sites	Min	Minuten
GBP4	Guanylate binding protein 4	mM	Millimolar

μg	Mikrogramm	s	Sekunde(n)
mg	Milligramm	SDS	Sodiumdodecylsulfat
μl	Mikroliter	siRNA	Small interfering RNA
ml	Milliliter	STAT	Signal transducer and activator of transcription
MRC5	Humane primäre Lungenfibroblasten	TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
mRNA	messenger RNA	Tat	Trans-activator of transcription
MWES	Medium 199 with Earle's Salts	Temp.	Temperatur
NaCl	Natrium Chlorid	Tet	Tetracyclin
ng	Nanogramm	TetO	Tet-Operator
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen	TetR	Tet-Repressor
nls	nuclear localization sequence	TN	hCMV-Towne-Stamm
nm	Nanometer	TNF α	Tumornekrosefaktor α
OD	Optische Dichte	TR _L	Terminal repeat long
PBS	Phosphat buffered saline	TR _S	Terminal repeat short
PCR	Polymerasekettenreaktion	U _L	Unique long
PFA	Paraformaldehyd	U _S	Unique short
PFU	Plaque forming unit	UV	Ultraviolet
Pol	Polymerase	V	Volt
Rev	regulator of expression of virion proteins	VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus
RRE	Rev-responsive element	v/v	volume per volume
RNA	Ribonukleinsäure	w/v	weight per volume
RT	Raumtemperatur	z.B.	zum Beispiel
RT-qPCR	Quantitative real time PCR		
rpm	Umdrehungen (rotation) pro Minute		
rv	Reverse		

E.2. Literaturverzeichnis

- Adler B, Sinzger C** (2009) Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many or a crucial target for virus spread? *Thromb. Haemost.* 102:1057–1063.
- Adler SP, Nigro G** (2013) Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus. *Clin. Infect. Dis.* 57 Suppl 4:189–192.
- Ahn JH, Hayward GS** (1997) The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J. Virol.* 71:4599–4613.
- Amsler L, Verweij MC, DeFilippis VR** (2013) The tiers and dimensions of evasion of the type I interferon response by human cytomegalovirus. *J. Mol. Biol.* 425:4857–4871.
- Bao L, Cowan MJ, Dunham K, Horn B, McGuirk J, Gilman A, Lucas KG** (2012) Adoptive immunotherapy with CMV-specific cytotoxic T lymphocytes for stem cell transplant patients with refractory CMV infections. *J. Immunother.* 35:293–298.
- Bate SL, Dollard SC, Cannon MJ** (2010) Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin. Infect. Dis.* 50:1439–1447.
- Bellamy J** (1954) Cytomegalic inclusion-body disease occurring in twins. *Am. J. Clin. Pathol.* 24:1040–1043.
- Bentz GL, Jarquin-Pardo M, Chan G, Smith MS, Sinzger C, Yurochko AD** (2006) Human cytomegalovirus (HCMV) infection of endothelial cells promotes naive monocyte extravasation and transfer of productive virus to enhance hematogenous dissemination of HCMV. *J. Virol.* 80:11539–11555.
- Biagi E, Bambacioni F, Gaipa G, Casati C, Golay J, Biondi A, Introna M** (2001) Efficient lentiviral transduction of primary human acute myelogenous and lymphoblastic leukemia cells. *Haematologica* 86:13–16.

- Boeckh M, Boivin G** (1998) Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:533–554.
- Boeckh M, Geballe AP** (2011) Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Invest.* 121:1673–1680.
- Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA** (1996) Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood* 88:4063–4071.
- Bolovan-Fritts CA, Trout RN, Spector SA** (2007) High T-cell response to human cytomegalovirus induces chemokine-mediated endothelial cell damage. *Blood* 110:1857–1863.
- Bonjardim CA, Ferreira PCP, Kroon EG** (2009) Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol. Lett.* 122:1–11.
- Boppana S, Fowler Karen** (2007) HCMV: persistence in the population: epidemiology and transmission. In: Arvin AM (Hrsg) *Human herpesviruses*. Cambridge University Press, New York:795–813.
- Britt W** (2008) Manifestations of Human Cytomegalovirus Infection: Proposed Mechanisms of Acute and Chronic Disease. In: Shenk T, Stinski M (Hrsg) *Human cytomegalovirus*. Springer, Berlin:417–470.
- Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS** (2011) Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol.* 21:240–255.
- Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB** (2010) Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 20:202–213.
- Caposio P, Musso T, Luganini A, Inoue H, Gariglio M, Landolfo S, Gribaudo G** (2007) Targeting the NF-kappaB pathway through pharmacological inhibition of IKK2 prevents human cytomegalovirus replication and virus-induced inflammatory response in infected endothelial cells. *Antiviral. Res.* 73:175–184.

- Caposio P, Orloff SL, Streblow DN** (2011) The role of cytomegalovirus in angiogenesis. *Virus Res.* 157:204–211.
- Castillo JP, Frame FM, Rogoff HA, Pickering MT, Yurochko AD, Kowalik TF** (2005) Human cytomegalovirus IE1-72 activates ataxia telangiectasia mutated kinase and a p53/p21-mediated growth arrest response. *J. Virol.* 79:11467–11475.
- Castillo JP, Kowalik TF** (2002) Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* 290:19–34.
- Cheeran MC, Hu S, Sheng WS, Peterson PK, Lokensgard JR** (2003) CXCL10 production from cytomegalovirus-stimulated microglia is regulated by both human and viral interleukin-10. *J. Virol.* 77:4502–4515.
- Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhäuser M, Groth C, Einsele H, Silverman M, Mullane KM, Brown J, Nowak H, Kölling K, Stobernack HP, Lischka P, Zimmermann H, Rübsamen-Schaeff H, Champlin RE, Ehninger G** (2014) Letermovir for cytomegalovirus prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 370:1781–1789.
- Cheng J, Ke Q, Jin Z, Wang H, Kocher O, Morgan JP, Zhang J, Crumpacker CS** (2009) Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure. *PLoS Pathog.* 5:e1000427.
- Cimarelli A, Darlix J** (2014) HIV-1 reverse transcription. *Methods Mol. Biol.* 1087:55–70.
- Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, Zhang W, Kraus MH** (2008) Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity. *Cancer Res.* 68:724–730.
- Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K** (1998) Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J. Exp. Med.* 187:2009–2021.

- Crescioli C, Buonamano A, Scolletta S, Sottili M, Francalanci M, Giomarelli P, Biagioli B, Lisi G, Pradella F, Serio M, Romagnani P, Maccherini M** (2009) Predictive role of pretransplant serum CXCL10 for cardiac acute rejection. *Transplantation* 87:249–255.
- Curbishley SM, Eksteen B, Gladue RP, Lalor P, Adams DH** (2005) CXCR 3 activation promotes lymphocyte transendothelial migration across human hepatic endothelium under fluid flow. *Am. J. Pathol.* 167:887–899.
- Dahle AJ, Fowler KB, Wright JD, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF** (2000) Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J. Am. Acad. Audiol.* 11:283–290.
- Dander E, Li Pira G, Biagi E, Perseghin P, Renoldi G, Gaipa G, Introna M, Marin V, Manca F, Biondi A, D'Amico G** (2008) Characterization of migratory activity and cytokine profile of helper and cytotoxic CMV-specific T-cell lines expanded by a selective peptide library. *Exp. Hematol.* 36:473–485.
- Datta D, Contreras AG, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Briscoe DM, Pal S** (2008) Calcineurin inhibitors modulate CXCR3 splice variant expression and mediate renal cancer progression. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19:2437–2446.
- Datta D, Flaxenburg JA, Laxmanan S, Geehan C, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Briscoe DM, Pal S** (2006) Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res.* 66:9509–9518.
- Doerr HW** (2010) Herpesviren: Zytomegalieviren; Diagnose und Therapie. In: Doerr HW (Hrsg) *Medizinische Virologie*. Thieme, Stuttgart:669–675.
- Dollard SC, Grosse SD, Ross DS** (2007) New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol.* 17:355–363.
- Drebber U, Hardt A, Dienes H, Odenthal M** (2011) Zytomegalievirus. Pathologisch-anatomische Manifestation und Nachweisverfahren. *Pathologe* 32:418–427.

- Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyens C, Kotenko SV, Renauld J** (2004) Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J. Biol. Chem.* 279:32269–32274.
- Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB, Kalejta RF, McGregor Dallas SR, Smit M, Soroceanu L, Cobbs CS** (2012) Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro-oncology* 14:246–255.
- Ehlert JE, Addison CA, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM** (2004) Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J. Immunol.* 173:6234–6240.
- Einsele H, Kapp M, Grigoleit GU** (2008) CMV-specific T cell therapy. *Blood Cells Mol. Dis.* 40:71–75.
- Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, Ratliff NB, Young JB, McCarthy PM, Feng J, Novick AC, Fairchild RL** (2003) Chemokine and receptor-gene expression during early and late acute rejection episodes in human cardiac allografts. *Transplantation* 75:2044–2047.
- Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, Stenglein S, Nelson JA** (1998) Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J. Virol.* 72:5661–5668.
- Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA** (1992) The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N. Engl. J. Med.* 326:663–667.
- Freed DC, Tang Q, Tang A, Li F, He X, Huang Z, Meng W, Xia L, Finnefrock AC, Durr E, Espeseth AS, Casimiro DR, Zhang N, Shiver JW, Wang D, An Z, Fu T** (2013) Pentameric complex of viral glycoprotein H is the primary target for potent neutralization by a human cytomegalovirus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:4997–5005.
- Gandhi MK, Khanna R** (2004) Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect. Dis.* 4:725–738.

- Gawn JM, Greaves RF** (2002) Absence of IE1 p72 protein function during low-multiplicity infection by human cytomegalovirus results in a broad block to viral delayed-early gene expression. *J. Virol.* 76:4441–4455.
- Gerna G, Baldanti F, Revello MG** (2004) Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Hum. Immunol.* 65:381–386.
- Ghazi A, Ashoori A, Hanley PJ, Brawley VS, Shaffer DR, Kew Y, Powell SZ, Grossman R, Grada Z, Scheurer ME, Hegde M, Leen AM, Bollard CM, Rooney CM, Heslop HE, Gottschalk S, Ahmed N** (2012) Generation of polyclonal CMV-specific T cells for the adoptive immunotherapy of glioblastoma. *J. Immunother.* 35:159–168.
- Goddard S, Williams A, Morland C, Qin S, Gladue R, Hubscher SG, Adams DH** (2001) Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation* 72:1957–1967.
- Goodrum F, Caviness K, Zagallo P** (2012) Human cytomegalovirus persistence. *Cell. Microbiol.* 14:644–655.
- Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T** (2002) Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16255–16260.
- Greaves RF, Mocarski ES** (1998) Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J. Virol.* 72:366–379.
- Grefte A, Blom N, van der Giessen M, van Son W, The TH** (1993a) Ultrastructural analysis of circulating cytomegalic cells in patients with active cytomegalovirus infection: evidence for virus production and endothelial origin. *J. Infect. Dis.* 168:1110–1118.
- Grefte A, van der Giessen M, van Son W, The TH** (1993b) Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J. Infect. Dis.* 167:270–277.

Gruh I, Wunderlich S, Winkler M, Schwanke K, Heinke J, Blömer U, Ruhparwar A, Rohde B, Li R, Haverich A, Martin U (2008) Human CMV immediate-early enhancer: a useful tool to enhance cell-type-specific expression from lentiviral vectors. *J. Gene. Med.* 10:21–32.

Grundy JE, Lawson KM, MacCormac LP, Fletcher JM, Yong KL (1998) Cytomegalovirus-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C chemokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration. *J. Infect. Dis.* 177:1465–1474.

Hahn G, Khan H, Baldanti F, Koszinowski UH, Revello MG, Gerna G (2002) The human cytomegalovirus ribonucleotide reductase homolog UL45 is dispensable for growth in endothelial cells, as determined by a BAC-cloned clinical isolate of human cytomegalovirus with preserved wild-type characteristics. *J. Virol.* 76:9551–9555.

Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, Wagner M, Gallina A, Milanesi G, Koszinowski U, Baldanti F, Gerna G (2004) Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J. Virol.* 78:10023–10033.

Hayhurst GP, Bryant LA, Caswell RC, Walker SM, Sinclair JH (1995) CCAAT box-dependent activation of the TATA-less human DNA polymerase alpha promoter by the human cytomegalovirus 72-kilodalton major immediate-early protein. *J. Virol.* 69:182–188.

Hendrix MG, Dormans PH, Kitslaar P, Bosman F, Bruggeman CA (1989) The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. *Am. J. Pathol.* 134:1151–1157.

Ho DD, Rota TR, Andrews CA, Hirsch MS (1984) Replication of human cytomegalovirus in endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 150:956–957.

Hokeness KL, Deweerd ES, Munks MW, Lewis CA, Gladue RP, Salazar-Mather TP (2007) CXCR3-dependent recruitment of antigen-specific T lymphocytes to the liver during murine cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 81:1241–1250.

Huh YH, Kim YE, Kim ET, Park JJ, Song MJ, Zhu H, Hayward GS, Ahn J (2008) Binding STAT2 by the acidic domain of human cytomegalovirus IE1 promotes viral growth and is negatively regulated by SUMO. *J. Virol.* 82:10444–10454.

Hu Y, Wang J, Yang B, Zheng N, Qin M, Ji Y, Lin G, Tian L, Wu X, Wu L, Sun B (2011) Guanylate binding protein 4 negatively regulates virus-induced type I IFN and antiviral response by targeting IFN regulatory factor 7. *J. Immunol.* 187:6456–6462.

Hwang E, Zhang Z, Cai H, Huang DY, Huong S, Cha C, Huang E (2009) Human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with p53 and inhibits p53-dependent transactivation by a mechanism different from that of IE2-86 protein. *J. Virol.* 83:12388–12398.

Indolfi G, Heaton N, Smith M, Mieli-Vergani G, Zuckerman M (2012) Effect of early EBV and/or CMV viremia on graft function and acute cellular rejection in pediatric liver transplantation. *Clin. Transplant.* 26:55–61.

Jackson JA, Kim EJ, Begley B, Cheeseman J, Harden T, Perez SD, Thomas S, Warshaw B, Kirk AD (2011) Urinary chemokines CXCL9 and CXCL10 are noninvasive markers of renal allograft rejection and BK viral infection. *Am. J. Transplant.* 11:2228–2234.

Jarvis MA, Nelson JA (2007) Human cytomegalovirus tropism for endothelial cells: not all endothelial cells are created equal. *J. Virol.* 81:2095–2101.

Jinquan T, Quan S, Jacobi HH, Jing C, Millner A, Jensen B, Madsen HO, Ryder LP, Svejgaard A, Malling HJ, Skov PS, Poulsen LK (2000) CXC chemokine receptor 3 expression on CD34(+) hematopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon gamma-inducible protein 10 and monokine induced by interferon gamma. *Blood* 96:1230–1238.

Johnsen JI, Baryawno N, Söderberg-Nauclér C (2011) Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? *Oncotarget* 2:1329–1338.

- Kenneson A, Cannon MJ** (2007) Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* 17:253–276.
- Kharfan-Dabaja MA, Boeckh M, Wilck MB, Langston AA, Chu AH, Wloch MK, Guterwill DF, Smith LR, Rolland AP, Kenney RT** (2012) A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 12:290–299.
- Knoblauch T** (2010) Das Cytomegalievirus IE1-Protein als Regulator des humanen Transkriptoms und Zielstruktur RNAi-basierter Therapiestrategien, Publikationsserver der Universität Regensburg, Regensburg.
- Knoblauch T, Grandel B, Seiler J, Nevels M, Paulus C** (2011) Human cytomegalovirus IE1 protein elicits a type II interferon-like host cell response that depends on activated STAT1 but not interferon- γ . *PLoS Pathog.* 7:e1002016.
- Koskinen PK, Kallio EA, Tikkanen JM, Sihvola RK, Häyry PJ, Lemström KB** (1999) Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. *Transpl. Infect. Dis.* 1:115–126.
- Koszinowski UH** (2010) Herpesviren: Zytomegalieviren; Grundlagen. In: Doerr HW (Hrsg) Medizinische Virologie. Thieme, Stuttgart:666–669.
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP** (2003) IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol.* 4:69–77.
- Kurath S, Halwachs-Baumann G, Müller W, Resch B** (2010) Transmission of cytomegalovirus via breast milk to the prematurely born infant: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* 16:1172–1178.
- Kute VB, Vanikar AV, Shah PR, Gumber MR, Patel HV, Godara SM, Munjappa BC, Sainaresh VV, Engineer DP, Jain SH, Modi PR, Shah VR, Trivedi VB, Trivedi HL** (2012) Post-renal transplant cytomegalovirus infection: study of risk factors. *Transplant. Proc.* 44:706–709.

- Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H** (2009) CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173:310–317.
- Lafemina RL, Pizzorno MC, Mosca JD, Hayward GS** (1989) Expression of the acidic nuclear immediate-early protein (IE1) of human cytomegalovirus in stable cell lines and its preferential association with metaphase chromosomes. *Virology* 172:584–600.
- Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, Cosmi L, Sagrinati C, Mazzinghi B, Orlando C, Maggi E, Marra F, Romagnani S, Serio M, Romagnani P** (2003) An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.* 197:1537–1549.
- León K, García-Martínez K, Carmenate T** (2013) Mathematical Models of the Impact of IL2 Modulation Therapies on T Cell Dynamics. *Front. Immunol.* 4:439.
- Levraud J, Boudinot P, Colin I, Benmansour A, Peyrieras N, Herbomel P, Lutfalla G** (2007) Identification of the zebrafish IFN receptor: implications for the origin of the vertebrate IFN system. *J. Immunol.* 178:4385–4394.
- Li M, Husic N, Lin Y, Christensen H, Malik I, McIver S, LaPash Daniels CM, Harris DA, Kotzbauer PT, Goldberg MP, Snider BJ** (2010) Optimal promoter usage for lentiviral vector-mediated transduction of cultured central nervous system cells. *J. Neurosci. Methods* 189:56–64.
- Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK** (2011) CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22:121–130.
- Ljungman P, Griffiths P, Paya C** (2002) Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 34:1094–1097.
- Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggolini M, Moser B** (1996) Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184:963–969.

- Lübeck PR, Doerr HW, Rabenau HF** (2010) Epidemiology of human cytomegalovirus (HCMV) in an urban region of Germany: what has changed? *Med. Microbiol. Immunol.* 199:53–60.
- Ludwig A, Hengel H** (2009) Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Euro. Surveill.* 14:26–32.
- Lüllmann-Rauch R** (2006) Taschenlehrbuch Histologie. Thieme, Stuttgart:241.
- Lurain NS, Chou S** (2010) Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 23:689–712.
- MacCormac LP, Grundy JE** (1999) Two clinical isolates and the Toledo strain of cytomegalovirus contain endothelial cell tropic variants that are not present in the AD169, Towne, or Davis strains. *J. Med. Virol.* 57:298–307.
- Maidji E, Percivalle E, Gerna G, Fisher S, Pereira L** (2002) Transmission of human cytomegalovirus from infected uterine microvascular endothelial cells to differentiating/invasive placental cytotrophoblasts. *Virology* 304:53–69.
- Marchini A, Liu H, Zhu H** (2001) Human cytomegalovirus with IE-2 (UL122) deleted fails to express early lytic genes. *J. Virol.* 75:1870–1878.
- Martin DF, Sierra-Madero J, Walmsley S, Wolitz RA, Macey K, Georgiou P, Robinson CA, Stempien MJ** (2002) A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis. *N. Engl. J. Med.* 346:1119–1126.
- Marty FM, Ljungman P, Papanicolaou GA, Winston DJ, Chemaly RF, Strasfeld L, Young JH, Rodriguez T, Maertens J, Schmitt M, Einsele H, Ferrant A, Lipton JH, Villano SA, Chen H, Boeckh M** (2011) Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect. Dis.* 11:284–292.
- Maul GG** (2008) Initiation of cytomegalovirus infection at ND10. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:117–132.

- McGraw BR, Marinus MG** (1980) Isolation and characterization of Dam+ revertants and suppressor mutations that modify secondary phenotypes of dam-3 strains of Escherichia coli K-12. *Mol. Gen. Genet.* 178:309–315.
- McVoy MA, Adler SP** (1994) Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* 68:1040–1051.
- Mehler K, Oberthuer A, Lang-Roth R, Kribs A** (2014) High rate of symptomatic cytomegalovirus infection in extremely low gestational age preterm infants of 22-24 weeks' gestation after transmission via breast milk. *Neonatology* 105:27–32.
- Melter M, Exeni A, Reinders ME, Fang JC, McMahon G, Ganz P, Hancock WW, Briscoe DM** (2001) Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection. *Circulation* 104:2558–2564.
- Mercorelli B, Lembo D, Palù G, Loregian A** (2011) Early inhibitors of human cytomegalovirus: state-of-art and therapeutic perspectives. *Pharmacol. Ther.* 131:309–329.
- Mercorelli B, Sinigalia E, Loregian A, Palù G** (2008) Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev. Med. Virol.* 18:177–210.
- Michaelis M, Baumgarten P, Mittelbronn M, Driever PH, Doerr HW, Cinatl J** (2011) Oncomodulation by human cytomegalovirus: novel clinical findings open new roads. *Med. Microbiol. Immunol.* 200:1–5.
- Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J** (2009) The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia* 11:1–9.
- Miller MS, Hertel L** (2009) Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblasts requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. *J. Virol.* 83:7015–7028.
- Mocarski E, Shenk T, Pass R** (2007) Cytomegaloviruses. In: Knipe DM, Howley P (Hrsg) *Fields' virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia:2701–2772.

- Mocarski ES, Kemble GW, Lyle JM, Greaves RF** (1996) A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:11321–11326.
- Modlin JF, Grant PE, Makar RS, Roberts DJ, Krishnamoorthy KS** (2003) Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 25-2003. A newborn boy with petechiae and thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.* 349:691–700.
- Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U** (2010) Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Neckar:544-600.
- Murphy E, Shenk T** (2008) Human cytomegalovirus genome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:1–19.
- Murphy E, Yu D, Grimwood J, Schmutz J, Dickson M, Jarvis MA, Hahn G, Nelson JA, Myers RM, Shenk TE** (2003) Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:14976–14981.
- Nevels M, Brune W, Shenk T** (2004) SUMOylation of the human cytomegalovirus 72-kilodalton IE1 protein facilitates expression of the 86-kilodalton IE2 protein and promotes viral replication. *J. Virol.* 78:7803–7812.
- Nigro G** (2009) Maternal-fetal cytomegalovirus infection: from diagnosis to therapy. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 22:169–174.
- Njeru DG, Mwanda WO, Kitonyi GW, Njagi EC** (2009) Prevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors at the National Blood Transfusion Centre, Nairobi. *East. Afr. Med. J.* 86:58–61.
- Novick D, Cohen B, Rubinstein M** (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77:391–400.
- Ojala PM, Sodeik B, Ebersold MW, Kutay U, Helenius A** (2000) Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20:4922–4931.

- Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, Fujita T** (2007) Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J. Biol. Chem.* 282:7576–7581.
- Oram RJ, Herold BC** (1998) Antiviral agents for herpes viruses. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17:652–653.
- Palestine AG, Polis MA, Smet MD de, Baird BF, Falloon J, Kovacs JA, Davey RT, Zurlo JJ, Zunich KM, Davis M** (1991) A randomized, controlled trial of foscarnet in the treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Ann. Intern. Med.* 115:665–673.
- Paschale M de, Agrappi C, Manco MT, Clerici P** (2010) Positive predictive value of anti-HCMV IgM as an index of primary infection. *J. Virol. Methods* 168:121–125.
- Paulus C, Krauss S, Nevels M** (2006) A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:3840–3845.
- Paulus C, Nevels M** (2009) The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses. *Viruses* 1:760–779.
- Paya C, Humar A, Dominguez E, Washburn K, Blumberg E, Alexander B, Freeman R, Heaton N, Pescovitz MD** (2004) Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 4:611–620.
- Peggs KS, Verfuerth S, Pizzey A, Khan N, Guiver M, Moss PA, Mackinnon S** (2003) Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 362:1375–1377.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR** (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 202:8–32.
- Piali L, Weber C, LaRosa G, Mackay CR, Springer TA, Clark-Lewis I, Moser B** (1998) The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig. *Eur. J. Immunol.* 28:961–972.

- Planitzer CB, Saemann MD, Gajek H, Faracet MR, Kreil TR** (2011) Cytomegalovirus neutralization by hyperimmune and standard intravenous immunoglobulin preparations. *Transplantation* 92:267–270.
- Potena L, Holweg CTJ, Chin C, Luikart H, Weisshaar D, Narasimhan B, Fearon WF, Lewis DB, Cooke JP, Mocarski ES, Valentine HA** (2006) Acute rejection and cardiac allograft vascular disease is reduced by suppression of subclinical cytomegalovirus infection. *Transplantation* 82:398–405.
- Prichard MN, Penfold ME, Duke GM, Spaete RR, Kemble GW** (2001) A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains. *Rev. Med. Virol.* 11:191–200.
- Qi R, Hua-Song Z, Xiao-Feng Z** (2013) Leflunomide inhibits the apoptosis of human embryonic lung fibroblasts infected by human cytomegalovirus. *Eur. J. Med. Res.* 18:3.
- Raghavan B, Cook CH, Trgovcich J** (2014) The Carboxy Terminal Region of the Human Cytomegalovirus Immediate Early 1 (IE1) Protein Disrupts Type II Interferon Signaling. *Viruses* 6:1502–1524.
- Rahav G** (2007) Congenital cytomegalovirus infection - a question of screening. *Isr. Med. Assoc. J.* 9:392–394.
- Reeves MB, Coleman H, Chadderton J, Goddard M, Sissons JGP, Sinclair JH** (2004) Vascular endothelial and smooth muscle cells are unlikely to be major sites of latency of human cytomegalovirus in vivo. *J. Gen. Virol.* 85:3337–3341.
- Reeves M, Sinclair J** (2008) Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:297–313.
- Reitsma JM, Sato H, Nevels M, Terhune SS, Paulus C** (2013) Human cytomegalovirus IE1 protein disrupts interleukin-6 signaling by sequestering STAT3 in the nucleus. *J. Virol.* 87:10763–10776.

- Renneson J, Dutta B, Goriely S, Danis B, Lecomte S, Laes J, Tabi Z, Goldman M, Marchant A** (2009) IL-12 and type I IFN response of neonatal myeloid DC to human CMV infection. *Eur. J. Immunol.* 39:2789–2799.
- Reusser P, Einsele H, Lee J, Volin L, Rovira M, Engelhard D, Finke J, Cordonnier C, Link H, Ljungman P** (2002) Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99:1159–1164.
- Revello MG, Gerna G** (2010) Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. *Rev. Med. Virol.* 20:136–155.
- Revello MG, Percivalle E, Di Matteo A, Morini F, Gerna G** (1992) Nuclear expression of the lower matrix protein of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes of immunocompromised viraemic patients. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 2):437–442.
- Rivière L, Darlix J, Cimarelli A** (2010) Analysis of the viral elements required in the nuclear import of HIV-1 DNA. *J. Virol.* 84:729–739.
- Rosenblum JM, Zhang Q, Siu G, Collins TL, Sullivan T, Dairaghi DJ, Medina JC, Fairchild RL** (2009) CXCR3 antagonism impairs the development of donor-reactive, IFN-gamma-producing effectors and prolongs allograft survival. *Transplantation* 87:360–369.
- Rotondi M, Lazzeri E, Romagnani P, Serio M** (2003) Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: an expanding field. *J. Endocrinol. Invest.* 26:177–180.
- Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC** (2006) Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J. Virol.* 80:710–722.
- Schindler C, Plumlee C** (2008) Interferons pen the JAK-STAT pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19:311–318.

- Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE** (2011) Pillars article: Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *J. Immunol.* 187:5489–5494.
- Schleiss MR** (2008) Cytomegalovirus vaccine development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:361–382.
- Schreiber A, Härter G, Schubert A, Bunjes D, Mertens T, Michel D** (2009) Antiviral treatment of cytomegalovirus infection and resistant strains. *Expert. Opin. Pharmacother.* 10:191–209.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA** (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75:163–189.
- Shen Y, Zhu H, Shenk T** (1997) Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94:3341–3345.
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM** (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat. Immunol.* 4:63–68.
- Sinclair J** (2008) Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J. Clin. Virol.* 41:180–185.
- Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, Briscoe DM, Datta D** (2012) Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.*:1-9
- Sinzger C, DMJG** (2008) Cytomegalovirus Cell Tropism. In: Shenk T, Stinski M (Hrsg) *Human cytomegalovirus*. Springer, Berlin:63–84.
- Sinzger C, Jahn G** (1996) Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 39:302–319.

- Smith JM, Corey L, Bittner R, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, McDonald RA** (2010) Subclinical viremia increases risk for chronic allograft injury in pediatric renal transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21:1579–1586.
- Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A** (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136:1007–1021.
- Soroceanu L, Cobbs CS** (2011) Is HCMV a tumor promoter? *Virus Res.* 157:193–203.
- Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C** (2010) Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43:359–361.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD** (1998) How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67:227–264.
- Stinski MF** (1978) Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J. Virol.* 26:686–701.
- Streblow DN, Dumortier J, Moses AV, Orloff SL, Nelson JA** (2008) Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that promote angiogenesis and wound healing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 325:397–415.
- Streblow DN, Kreklywich C, Yin Q, La Melena VT de, Corless CL, Smith PA, Brakebill C, Cook JW, Vink C, Bruggeman CA, Nelson JA, Orloff SL** (2003) Cytomegalovirus-mediated upregulation of chemokine expression correlates with the acceleration of chronic rejection in rat heart transplants. *J. Virol.* 77:2182–2194.
- Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK** (1992) A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* 358:162–164.
- Suyama T, Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ichikawa T, Ueda T, Nikaido T, Ito H, Ishikura H** (2005) Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXCR3 in human renal cell carcinoma. *Cancer* 103:258–267.

- Taniguchi T, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M** (1980) Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:4003–4006.
- Tavalai N, Stamminger T** (2009) Interplay between Herpesvirus Infection and Host Defense by PML Nuclear Bodies. *Viruses* 1:1240–1264.
- Trentin L, Agostini C, Facco M, Piazza F, Perin A, Siviero M, Gurrieri C, Galvan S, Adami F, Zambello R, Semenzato G** (1999) The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis. *J. Clin. Invest.* 104:115–121.
- van Boxel-Dezaire AHH, Rani MRS, Stark GR** (2006) Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 25:361–372.
- van de Berg PJEJ, Yong S, Remmerswaal EBM, van Lier RAW, Berge IJM ten** (2012) Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage. *Clin. Vaccine Immunol.* 19:772–779.
- van Ree RM, Vries APJ de, Zelle DM, Vries LV de, Oterdoom LH, Gans ROB, Schouten JP, Lems SPM, van Son WJ, Bakker SJL** (2011) Latent cytomegalovirus infection is an independent risk factor for late graft failure in renal transplant recipients. *Med. Sci. Monit.* 17:609–617.
- Waldman WJ, Knight DA, Huang EH, Sedmak DD** (1995) Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in vitro model. *J. Infect. Dis.* 171:263–272.
- Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR** (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* 333:1038–1044.
- Wang W, Patterson CE, Yang S, Zhu H** (2004) Coupling generation of cytomegalovirus deletion mutants and amplification of viral BAC clones. *J. Virol. Methods* 121:137–143.

- Wang Y, Roos KP, Taylor DE** (1993) Transformation of *Helicobacter pylori* by chromosomal metronidazole resistance and by a plasmid with a selectable chloramphenicol resistance marker. *J. Gen. Microbiol.* 139:2485–2493.
- Weseslindtner L, Nachbagauer R, Kundi M, Jaksch P, Kerschner H, Simon B, Hatos-Agyi L, Scheed A, Aberle JH, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E** (2011) Human cytomegalovirus infection in lung transplant recipients triggers a CXCL-10 response. *Am. J. Transplant* 11:542–552.
- Wolff DJ, Heaney DL, Neuwald PD, Stellrecht KA, Press RD** (2009) Multi-Site PCR-based CMV viral load assessment-assays demonstrate linearity and precision, but lack numeric standardization: a report of the association for molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* 11:87–92.
- Zhao DX, Hu Y, Miller GG, Luster AD, Mitchell RN, Libby P** (2002) Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. *J. Immunol.* 169:1556–1560.
- Zhu H, Shen Y, Shenk T** (1995) Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J. Virol.* 69:7960–7970.
- Zlotnik A, Yoshie O** (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121–127.

E.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der IFN-Signalwege	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Herstellung von TetR-, TetR-Puro- und TetR-IE1-Zellen	41
Abbildung 3: Schematische Darstellung der verwendeten Verpackungspasmide	43
Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten retroviralen Vektoren.....	44
Abbildung 5: Charakterisierung der lentiviralen Plasmide pLKOneo.CMV.EGFPnlsTetR (# 689,A), pMD2.G (# 691,A), psPAX2 (# 693,B,C) und pLKO.hCMV.TetO.cIE1 (# 696,D) durch Restriktionsverdau	46
Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Produktion von transgenen Zelllinien.....	47
Abbildung 7: Vergleich der Lentivirusproduktion in H1299- und 293T-Zellen mittels RT-qPCR-Analyse (A, B) und Immunfluoreszenzmikroskopie (C, D).....	48
Abbildung 8: Verbesserte Transfektionsrate durch Ultrazentrifugation der Lentivirus-haltigen Überstände	50
Abbildung 9: Zentrifugation während der Transduktion führt zu keiner verbesserten Lentivirusaufnahme	51
Abbildung 10: RT-qPCR-Analyse der Gene CXCL10, CXCL11 und GBP4 in TetR- und TetR-IE1-Zellen....	54
Abbildung 11: RT-qPCR-Analyse der IFN-Induzierbarkeit IE1-abhängig regulierter Gene.....	55
Abbildung 12: RT-qPCR-Analyse der Gene CXCL9, CXCL10, CXCL11 und IE1 in unbehandelten, TetR-TetR-Puro- und TetR-IE1-Fibroblasten	56
Abbildung 13: Die Langzeitinduktion von IE1 in Fibroblasten zeigt eine maximale Expression von CXCL10 und GBP4 nach 10 Tagen	58
Abbildung 14: Geringer Einfluss der IE1-Expression auf eine spätere IFNγ-Stimulation	60
Abbildung 15: Kein synergistischer Effekt der IE1-Expression auf die Gleichgewichtsmenge von CXCL10 nach IFNγ-Stimulation	61
Abbildung 16: Die Expression von IE1 hat keinen Einfluss auf die Kinetik der CXCL10-Aktivierung nach IFNγ-Stimulation.....	63
Abbildung 17: Die IE1-vermittelte ISG-Induktion ist unabhängig von IFN-neutralisierenden Antikörpern	64
Abbildung 18: Der IFNγ-Rezeptor Knockdown zeigt nur einen geringen Einfluss auf die IE1-vermittelte Aktivierung humaner Gene in der RT-qPCR-Analyse	66

Abbildung 19: Einfluss des Sekretoms von induzierten TetR-IE1-Zellen auf eine Infektion mit einem TN-Virusstamm (Plaquebildung)	68
Abbildung 20: PCR zum Ausschluss einer Mykoplasmen-Verunreinigung der HUVEC-Kulturen	71
Abbildung 21: Fluoreszenzanalyse FX-infizierter MRC5 und HUVEC	72
Abbildung 22: Charakterisierung der TetR-IE1-HUVEC durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot.....	74
Abbildung 23: Charakterisierung der IE1-vermittelten ISG-Aktivierung in TetR-IE1-HUVEC durch RT-qPCR.....	76
Abbildung 24: Nachweis von CXCR3-Protein auf PBMC- und KG1-Zellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot	77
Abbildung 25: TNFα vermittelt im Gegensatz zu IFNγ die Adhäsion verschiedener monozytärer Zellen ..	79
Abbildung 26: IE1-exprimierende Zellen vermitteln keine verstärkte Adhäsion von unterschiedlichen monozytären Zellen.....	80
Abbildung 27: Modell zum Mechanismus der IE1-abhängigen ISG-Aktivierung.....	84

E.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper	15
Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper	15
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide.....	16
Tabelle 4: Verwendete siRNAs.....	17
Tabelle 5: Verwendete Plasmide	17
Tabelle 6: Verwendete humane Zelllinien	19
Tabelle 7: Verwendete Zytokine	20
Tabelle 8: LightCycler-Standardprotokoll.....	26
Tabelle 9: Eingesetzte Volumina bei der Subkultivierung von Zellen.....	31
Tabelle 10: Eingesetzte Plasmidmengen	35
Tabelle 11: Restriktionsenzymfragmente der verwendeten Plasmide	45

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei **Frau Dr. Christina Paulus** und **Herrn PD. Dr. Michael Nevels** für die sehr engagierte und umfassende Betreuung während meiner Datenerhebung und dem Verfassen dieser Arbeit. Neben einem breiten Spektrum an laborexperimentellen Methoden konnte ich durch ihre Hilfe auch meine Kenntnisse in der Auswertung und Interpretation der gewonnenen Daten vertiefen. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die kritische Durchsicht und Diskussion meines Manuskripts, sowie die Erstellung des Erstgutachtens durch Herrn PD. Dr. Michael Nevels.

Auch **Herrn Prof. Dr. med. Bernd Salzberger** möchte ich sehr für die Begutachtung meiner Arbeit als Zweitgutachter danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Dr. Andre Gessner** für die Möglichkeit meine Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft. Besonders **Kathrin Mücke, Ines Tschertner, Marion Zenger** und **Theresa Knoblach** danke ich für die Hilfe bei Einarbeitung und kurzweilige Zusammenarbeit.

Vielen Dank an **Arbeitsgruppe Hoenicka** aus der Herz-Thorax-Chirurgie der Universität Regensburg für Bereitstellung der HUVEC und **Karin Beckenlehner** und **Ines Tschertner** für die PBMC-Spende.

Von ganzem Herzen danke ich meiner **Familie**, meinen **Freunden** und besonders **Caro**. Insbesondere **meinen Eltern**, die mich durch das ganze Studium und die Promotion unterstützt haben danke ich sehr.