

**Die Rolle retinaler Perizyten nach einer Infektion mit dem
Humanen Zytomegalievirus und deren mögliche Bedeutung
für eine HCMV-Retinitis**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Denise Klassert
aus Meißen

Frankfurt am Main 2011
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Langer

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Dingermann

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung und Funktion von Perizyten im Organismus.....	1
1.2	Aufbau und Funktion Retina	3
1.3	HCMV Retinitis	6
1.4	Taxonomische Einordnung und die klinische Bedeutung des Humanen Zytomegalievirus (HCMV).....	9
1.5	Struktur des HCMV.....	10
1.5.1	Aufbau des Viruspartikels.....	10
1.5.2	Infektionszyklus von HCMV.....	11
1.5.3	Antivirale Antwort der Zelle.....	13
1.5.4	Die Immediate Early Proteine IE-1 72 kDa und IE-2 86 kDa.....	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.2	Kommerzielle Kits.....	19
2.1.3	Chemikalien und Medien.....	20
2.1.4	Enzyme	22
2.1.5	Antikörper.....	22
2.1.6	Plasmide.....	23
2.1.7	Primer und Sonden.....	24
2.1.8	Zelllinien.....	26
2.1.9	Bakterienstämme.....	26

2.1.10	Virusstämme.....	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellkultur.....	28
2.2.1.1	Präparation humaner retinaler Perizyten (HRP) und retinaler Pigmentepithelzellen (RPE) aus menschlichen Augen...	28
2.2.1.2	Präparation humaner Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) (nach Jaffe et al., 1973)	29
2.2.1.3	Kultivierung etablierter Zelllinien.....	30
2.2.1.4	Passagieren von konfluenten Zellen.....	30
2.2.1.5	Langzeitlagerung und Auftauen von eukaryotischen Zellen.....	30
2.2.1.6	Vitalitätstest mittels Trypanblau.....	31
2.2.2	Infektion mit HCMV.....	31
2.2.3	Titerbestimmung.....	32
2.2.4	Immunhistochemische/-zytochemische Färbung	32
2.2.5	May-Grünwald-/Giemsa-Färbung.....	33
2.2.6	Färbung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und Integrine am Durchflusszytometer	34
2.2.7	Mikrokinematographie.....	34
2.2.8	Elektronenmikroskopie (EM).....	35
2.2.9	Durchführung von Adhäsionsstudien (nach Sashwati et al., 1997)	36
2.2.10	Expressionsstudien mittels quantitativen RealTime-PCR.....	36
2.2.10.1	Präparation von Ribonukleinsäure (RNA).....	36
2.2.10.2	Reverse Transkription	37
2.2.10.3	Durchführung der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR).....	37
2.2.10.4	Relative Quantifizierung.....	38

2.2.11	Überprüfung der Chemokin-/Zytokinexpression mittels ELISA (R&D Systems, Abington, UK).....	38
2.2.11.1	Transfektion.....	39
2.2.11.1.1	Calciumphosphattransfektion (nach Chen, 1987 & Okayana, 1988)	39
2.2.11.1.2	Lipofectamine™2000 Transfektion (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).....	40
2.2.11.2	Transduktion mit lentiviralen Überständen.....	40
2.2.11.2.1	Herstellung lentiviraler Überstände.....	40
2.2.11.2.2	Titration der lentiviralen Überstände.....	41
2.2.11.2.2.1	Kristallviolett-Färbung zur Titerbestimmung	41
2.2.11.2.2.2	HIV-p24 Antigen ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, USA).....	41
2.2.11.2.3	Transduktion.....	42
2.2.11.3	Überprüfung der Tansfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie	42
2.2.12	Western Blot-Analyse.....	43
2.2.12.1	Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung.....	44
2.2.12.2	Gelelektrophorese	44
2.2.12.3	Immunhistochemischer Proteinnachweis.....	44
2.2.13	Nachweis der Untereinheiten p50 und p65 des Transkriptionsfaktors NF-κB.....	45
2.2.14	Bakterienkultur.....	45
2.2.15	Herstellung chemokompetenter E. coli-Zellen.....	46
2.2.16	Klonierung der Promotorkonstrukte.....	46
2.2.16.1	Herstellung von Promotorkonstrukten mittels PCR.....	46
2.2.16.2	Aufreinigung des PCR-Produktes.....	47
2.2.16.3	Agarose-Gelelektrophorese	48
2.2.16.4	Restriktionsverdau.....	48
2.2.16.5	Aufreinigung mittels präparativen Agarosegelen.....	49

2.2.16.6	Gel-Extraktion.....	49
2.2.16.7	Ligation.....	49
2.2.16.7.1	Ligation in geschnittenen pGL3-Basic Vektor.....	49
2.2.16.7.2	Transformation.....	50
2.2.16.8	Präparation von Plasmid-DNA.....	50
2.2.16.8.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA (nach Birnboim & Doly, 1979).....	50
2.2.16.8.2	Maxi-Präparation.....	51
2.2.16.9	Quantitative Bestimmung der Nukleinsäuren.....	52
2.2.16.10	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	52
2.2.17	Luciferase-Reportergenassay (Promega, Madison, USA).....	52
2.2.18	Durchführung des Luciferaseassays.....	53
2.2.19	Statistische Auswertung.....	54
3	Ergebnisse.....	55
3.1	Humane retinale Perizyten (HRP) als mögliches Zellmodell einer Zytomegalievirusinfektion.....	55
3.1.1	Isolation humaner retinaler Perizyten.....	55
3.1.2	Morphologische Darstellung von HRP mittels May-Grünwald-/Giemsa-Färbung.....	59
3.1.3	Charakterisierung von retinalen Perizyten.....	60
3.2	Analyse der Infektiosität von HCMV in HRP.....	63
3.2.1	Zytopathischer Effekt (CPE).....	63
3.2.2	Mikrokinematografische Aufnahmen.....	63
3.2.3	Analyse der IE und <i>late</i> Expression mittels Immunfluoreszenz- mikroskopie und qRT-PCR.....	65
3.2.4	Titration.....	67
3.2.5	Elektronenmikroskopische Aufnahmen HCMV-infizierter HRP.....	69

3.3	Expression von Transkriptionsfaktoren durch eine HCMV Infektion.....	70
3.3.1	Expressionsanalyse der NF- κ B Untereinheiten p50 und p65.....	70
3.3.2	Western-Blot Analyse der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SP-1.....	73
3.4	Analysen der ICAM-1 und Integrinexpression mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung.....	74
3.4.1	Analyse der ICAM-1 Expression.....	74
3.4.2	Analyse der EGF-Rezeptor- und Integrinexpression während einer HCMV-Infektion.....	76
3.5	Adhäsionsassay der mit HCMV infizierten Zellen	80
3.6	Expressionsanalyse von Chemokin- und Interleukingenen mittels qRT-PCR und ELISA.....	81
3.6.1	Expressionsanalyse der Chemokine und Interleukine nach Überexpression von IE1 und IE2	86
3.6.1.1	Expressionsanalysen der Chemokine und Interleukine nach Transduktion mit IE1/IE2-exprimierenden Lentiviren.....	86
3.6.1.2	Analyse von Transfektionseffizienzen mittels Calciumphosphat- und Lipofectamin ²⁰⁰⁰ -Tranfektion in Perizyten.....	87
3.6.1.2.1	qRT-PCR-Analyse	88
3.6.1.2.2	ELISA-Analysen.....	90
3.7	Luciferase-Reportergenassay.....	100
3.7.1	Herstellung der Promotorkonstrukte.....	100
3.7.2	Analyse der Promotoraktivitäten in HRP, HFF und Cos-7-Zellen.....	101
3.7.3	Luciferaseaktivität von Promotorkonstrukten der Chemokin-/Interleukingene und des ICAM-1-Gens nach Kotransfektion mit IE1- und IE2-Expressionsplasmiden	105

4	Diskussion.....	115
4.1	HCMV-Retinitis.....	115
4.1.1	Humane retinale Perizyten-Mitglieder der inneren Blut-Retina Schranke und ihre Rolle bei der HCMV-Retinitis.....	116
4.1.1.1	Isolation humaner retinaler Perizyten (HRP)	117
4.1.1.2	Infizierbarkeit der HRP im Vergleich zu RPE.....	120
4.1.1.3	Nachweis viraler Proteine und infektiöser Viruspartikel in Perizyten.....	120
4.2	Induktion inflammatorischer Prozesse in HRP durch eine HCMV-Infektion.....	122
4.2.1	Expression von Transkriptionsfaktoren durch HCMV.....	122
4.2.2	Expression des EGF-R und von Integrinen während einer HCMV-Infektion.....	123
4.2.3	ICAM-1 Expression und Leukozytenadhäsion in Perizyten.....	125
4.2.4	Zytokin- und Interleukinexpression während einer HCMV-Infektion.....	126
4.2.4.1	Zytokin- und Interleukinexpression durch die virale IE-Proteine.....	128
4.2.4.2	Promotoranalysen mittels Reporterassay	129
5	Zusammenfassung.....	134
6	Literaturverzeichnis.....	136
7	Abkürzungsverzeichnis	159
8	Veröffentlichungen	162
9	Lebenslauf	163
10	Erklärung	164
11	Eidesstattliche Versicherung	164
12	Danksagung.....	165

1.1 Bedeutung und Funktion von Perizyten im Organismus

Bereits vor über 100 Jahren wurde von Eberth und Rouget erstmalig der Perizyten-Zelltyp, auch als Rouget-Zellen oder Muralzellen bezeichnet, beschrieben (Eberth, 1871; Rouget, 1873). Zimmermann führte 1923 für diesen Zelltyp den noch heute verwendeten Begriff „Perizyten“ ein. Perizyten sind vorwiegend in Kapillaren und postkapillaren Venolen verschiedener Organe lokalisiert (Abbildung 1.1).

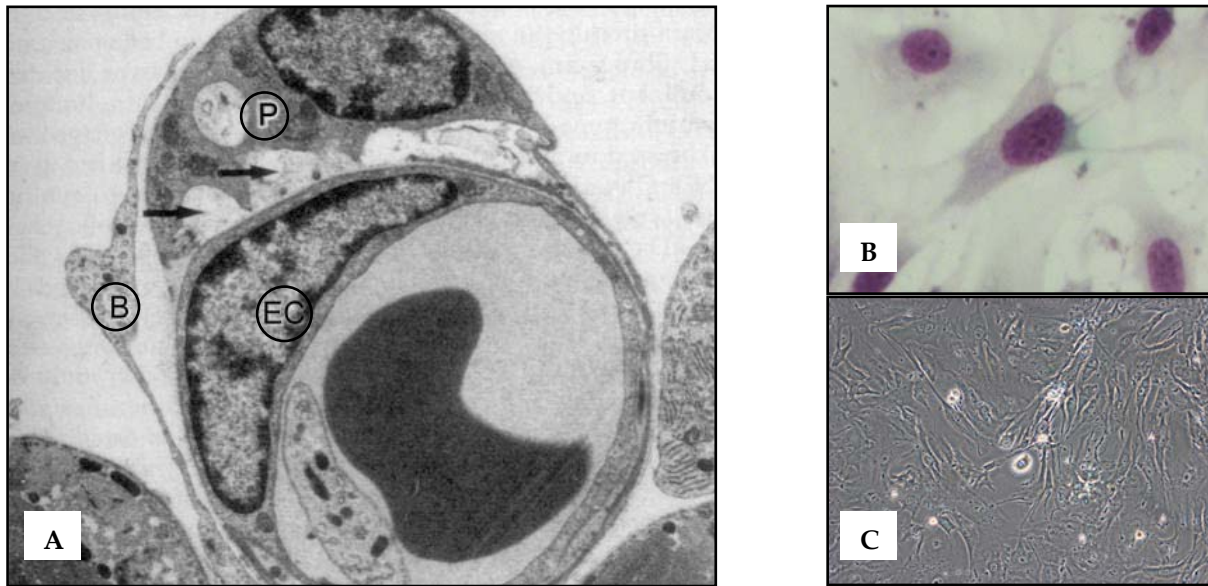


Abbildung 1.1: (A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Kapillare mit einem Perizyt (P) und einer Endothelzelle (EC), welche in die Basalmembran (B) eingebettet sind (Shepro and Morel, 1993). Die retinalen Perizyten haben eine (B) charakteristische sternförmige Morphologie, lange Zellausläufer und einen peripher lokalisierten Kern. (C) In Kultur haben sie unterschiedlich große Zellkörper und können mit ihren Zellausläufern übereinander wachsen.

Es wurde bereits 1961 beschrieben, dass Perizyten z. B. im Herz, Skelettmuskeln, in der Lunge, der Niere, im Gehirn und in allen okularen Geweben, insbesondere der Retina vorkommen (Cogan et al., 1961; Donahue & Pappas, 1961; Sims, 2000). Perizyten spielen bei verschiedenen vaskulären Signalwegen und der Aufrechterhaltung der Homöostase, der Blut-Hirn (BHS) sowie der Blut-Retina Schranke (BRS), dem intraokularen Druck, der Angiogenese und Neovaskularisierung eine wichtige Rolle (Fisher, 2009; Krueger & Bechmann, 2010). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Perizyten des zentralen Nervensystems dem Knochenmark entstammen und als Stammzellen im adulten Gehirn fungieren (Dore-Duffy et al., 2006 und 2008). Aufgrund ihrer Funktion im Zusammenhang mit der Kontraktion der Gefäße und ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften sowie dem Aufbau ihrer Mikrofilamente werden Perizyten oft mit vaskulären glatten Muskelzellen

verglichen (Tilton, 1991; Wiederholt et al., 1995). Jeder Perizyt besitzt einen Zellkörper mit einem spindelförmigen großen Kern und einem schmalen Zytoplasmasaum. An der äußeren Membran finden sich kernnah vesikelartige Einstülpungen (Abbildung 1.1). Neben zahlreichen Mitochondrien, freien und membranständigen Ribosomen, endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und Zentriolen besitzen Perizyten Mikrofilamente aus kontraktilen Proteinen. In Perizyten wird sowohl das *α -smooth muscle* (SM) Aktin, als auch das nicht-SM-Aktin und Myosin exprimiert. *α -smooth muscle*-Aktin ist eine Isoform des Aktins, welches typischerweise in glatten Muskelzellen vorkommt und für die kontraktilen Eigenschaften dieser Zellen verantwortlich ist. Die nicht SM-Aktin-Proteine werden hingegen nicht in glatten Muskelzellen exprimiert (Frank et al., 1990; Skalli et al., 1990; Bandopadhyay et al., 2001). Von den in die Basalmembran eingebetteten Zellkörpern erstrecken sich lange Fortsätze zu den darunter liegenden Endothelzellen aus. Diese stehen im direkten Kontakt zu den Endothelzellen (Abbildung 1.1). Dabei sind die Perizyten zirkulär ausgerichtet und bilden mit den Endothelzellen verschiedene Verbindungen, wie *tight junctions*, *gap-junctions*, *Adhäsionsplaques* sowie „peg and socket“ - Invaginationen (Cuevas et al., 1984; Allt & Lawrenson, 2001; Hosoya & Tomi, 2005). Über diese Verbindungen gelangen die im Blut zirkulierenden Substanzen, wie Glukose, Vitamin C und Aminosäuren zur Retina. Zusätzlich kann so ein Ionenaustausch stattfinden. Weiter ist diese Interaktion der beiden Zelltypen sehr bedeutsam für die Ausreifung, das Remodelling und die Aufrechterhaltung des vaskulären Systems durch Sekretion von Wachstumsfaktoren sowie der Modulation der extrazellulären Matrix (Hellstrom, 1999; Darland et al., 2001 und 2003; Scheef et al., 2009). Die Assoziation von Perizyten mit Endothelzellen ist essentiell für die Proliferation, Morphologie, Motilität und den Metabolismus vor allem in mikrovaskulären Endothelzellen während der Angiogenese. Insbesondere im verwundeten und erkrankten Gewebe, wie bei der Tumorgenese, der Alzheimer Erkrankung, der Mikroangiopathie bei Diabetes, der Multiplen Sklerose und bei Infektionen, ist das Zusammenspiel dieser beiden Zelltypen von entscheidender Bedeutung (DeNofrio et al., 1989; Allt & Lawrensen, 2001; Kane et al., 2008). Weiterhin wurde der Einfluss von Perizyten bei inflammatorischen Prozessen nachgewiesen. Zytokine bewirken eine morphologische Änderung der Perizytenform und eine Umbildung der endothelialen Kontakte. Die Perizytenfortsätze sind dann vermehrt in der Nähe interendothelialer Spalten zu finden, die für eine gesteigerte Gefäßpermeabilität verantwortlich sind (Egginton et al., 1996;

Sims, 2000). Im zentralen Nervensystem wurde die Fähigkeit der Perizyten zur Phagozytose nachgewiesen (Thomas et al., 1999).

1.2 Aufbau und Funktion der Retina

Die innersten Schichten des Auges bilden das retinale Pigmentepithel und die Netzhaut (Retina), die den Glaskörper umschließen (Abbildung 1.2). Die Retina gliedert sich dabei in die vorderen lichtunempfindlichen Abschnitte *pars caeca* und den hinteren lichtempfindlichen *pars optica retinae*. Der *pars optica* besteht aus zehn Schichten, dem Pigmentepithel und neun Schichten des *stratum nervosum*.

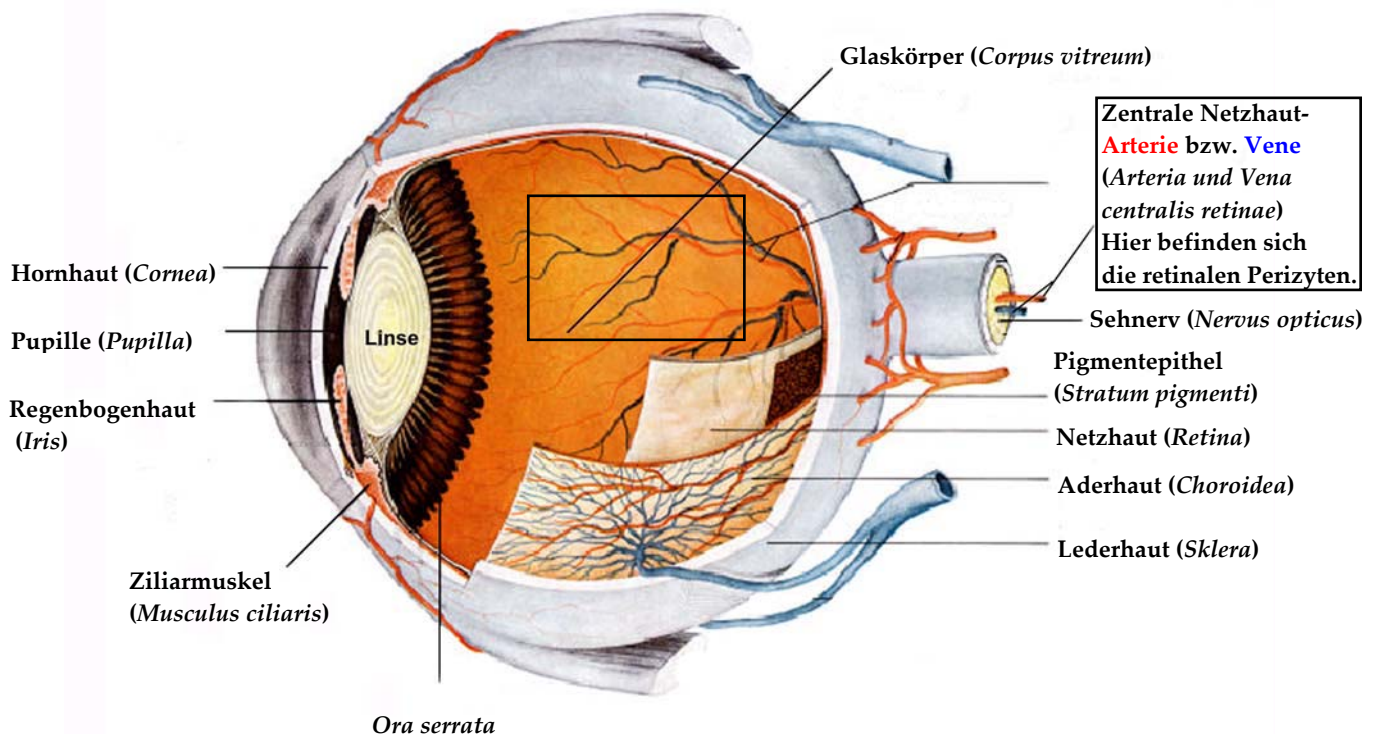


Abbildung 1.2: Schichtgliederung des Augapfels (*Bulbus oculi*). Das Auge ist lateral gefenstert dargestellt. Modifiziert nach Wagner, H. J.: Mikroskopische Anatomie der Organe – Auge und Retina, <http://anatom.uni-tuebingen.de/docs/MolHistoSS2004/XXAugeRetina.pdf>. In dem Bereich der Retina mit den arteriellen und venösen Gefäßen (umrandet) befinden sich humane retinale Perizyten (HRP).

In der Retina befinden sich spezielle Strukturen, wie der blinde und gelbe Fleck. Letzterer bildet den Bereich des schärfsten Sehens (*macula lutea* oder *fovea centralis*). Im blinden Fleck (*diskus* oder *papilla nervi optici*) sammeln sich alle Axone der Nervenzellen und bilden den *nervus opticus*. Hier liegen die Eintrittsstellen der *arteria centralis retinae* und der *vena centralis retinae*. Über diese und weiter verzweigte Arteriolen, Venolen und Kapillaren wird die

Netzhaut versorgt. Das räumlich hochdifferenzierte Kapillarnetz macht die Netzhaut zu einem der am dichtesten vaskularisierten Gewebe des Körpers.

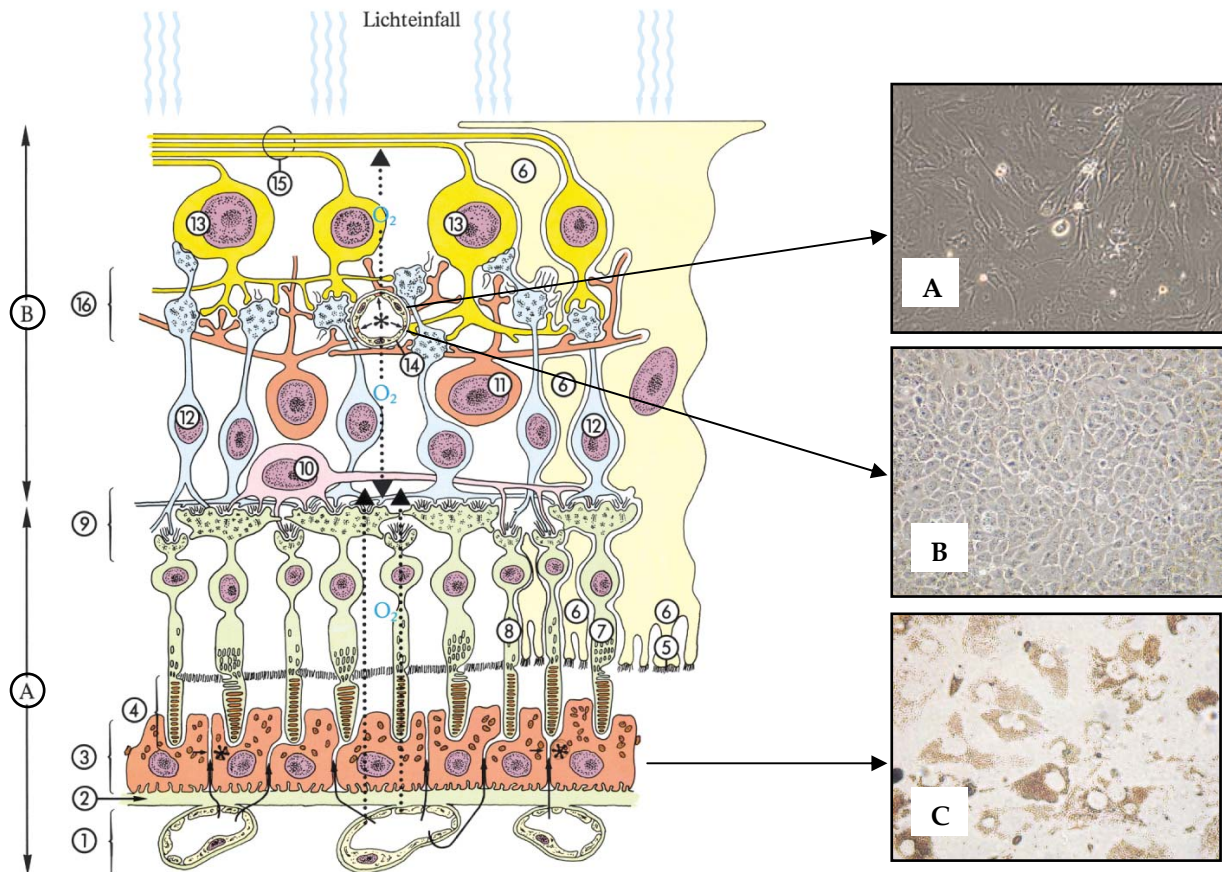


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Retina. (A) Retinale Perizyten, (B) mikrovaskuläre Endothelzellen (**B** innere Blut-Retina Schranke) und (C) die retinalen Pigmentepithelzellen (**A** äußere Blut-Retina-Schranke) sind wichtige Zelltypen der Retina. Abk.: 1, *choriocapillaris*; 2, Bruch'sche Membran; 3, retinales Pigmentepithel; 4, äußere Segmente der Stäbchen und Zapfen; 5, *membrana limitans externa*; 6, Müller's Glia; 7, Zapfen; 8, Stäbchen; 9, erste synaptische Kontaktzone; 10, horizontale Zelle; 11, amakrine Zelle; 12, bipolare Zelle; 13, Ganglion Zelle; 14, retinale Kapillare mit *zonulae occludentes* (innere Blut-Retina Schranke); 15, *nervus opticus* Fasern; 16, zweite synaptische Kontaktzone. Modifiziert nach Scholz et al., 2003.

Das Kapillarnetz der Retina bildet mit seiner Funktion als Blut-Retina Schranke eines der wichtigsten Regionen im Auge. Sie wird durch die *zonulae occludentes* (*tight junctions*) zwischen den Endothelzellen der intraretinalen Kapillaren gebildet und durch die *tight junctions* der retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) (Abbildung 1.3). Diese Barriere funktioniert ähnlich wie die Blut-Hirn Schranke, kann aber bei Durchblutungsstörungen, Bluthochdruck und intraokularen Entzündungen durchbrochen werden. Um dabei die

Diffusion zu erleichtern, sind die Kapillaren der *choriocapillaris* fenestriert und in einem fein verzweigten Netzwerk direkt unter der Retina und den RPE angeordnet. Dadurch tritt Plasma aus der *choriocapillaris* aus und sammelt sich unter dem RPE, welches mit seinen *tight junctions* und vielen Transportsystemen die äußere Blut-Retina Schranke bildet. Die innere Blut-Retina Schranke wird dahingegen direkt durch die retinalen Endothelzellen und Perizyten gebildet (Crane et al., 2000; Allt & Lawrenson, 2001; Bandopadhyay et al., 2001). Die Retina ist ein sehr komplexes, sensorisches Organ. Für ihre physiologische Funktion sind die Neurone in einer Schichtenstruktur organisiert. So wird die Entwicklung der Blutgefäßversorgung koordiniert. Genetische Defekte, aber auch andere Störungen dieser Prozesse können zu sehr schweren Erkrankungen des Sehsystems wie der Netzhautablösung bis hin zur Erblindung führen.

Die Perizyten nehmen, wie das retinale Pigmentepithel (RPE), zahlreiche Aufgaben in der Versorgung und im Schutz der Netzhaut wahr. Das RPE besteht aus einer einzelligen Schicht zwischen Netzhaut und Bruch'scher Membran. Die Zellen sind über *tight junctions* fest verbunden, so dass Substrate nur durch aktiven Transport in den Pigmentepithelzellen zwischen Netzhaut und Bruch'scher Membran transportiert werden können (äußere Blut-Retina Schranke). Eine wesentliche Aufgabe der Pigmentepithelzellen ist es, die abgeschnürten Endstücke der Photorezeptor-Außensegmente zu phagozytieren und innerhalb der Pigmentepithelzelle abzubauen. Retinale Perizyten sind ebenfalls über *tight junctions* fest verbunden, transportieren aktiv Substrate und können phagozytieren. Die innere sowie äußere BRS können somit die Retina vor Infektionen, wie z. B. mit HIV-1 und Herpesviren, insbesondere mit dem humanen Zytomegalievirus aber auch vor dem Angriff aktivierter Leukozyten schützen. Es konnte gezeigt werden, dass APOBEC3 (Apolipoprotein B mRNA-editierendes Enzym, katalytisches Polypeptid 3) in retinalen Endothelzellen, Pigmentepithelzellen und in Perizyten exprimiert wird und so die Zellen antiviral vor einer HIV-Retinopathie schützt (Lin et al., 2009). Bisher ist der molekulare Mechanismus des viralen Eintritts durch die BRS, die Infektion und die Ausbreitung in der Retina noch unklar. Es ist bisher bekannt, dass Gliazellen, mikrovaskuläre Endothelzellen und RPE Hauptziele einer HCMV-Infektion sind. Dabei ist die auftretende Nekrose in den infizierten Gebieten charakteristisch für eine Primärinfektion. Die Retina ist ein immunprivilegiertes Organ, das scheinbar von immunologischen Reaktionen ausgeschlossen ist (Madawar, 1948; Barker & Billingham, 1977). Diese Eigenschaft beruht vor allem auf anti-inflammatorischen Zytokinen,

wie den Transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2). Dieser verändert die Antigenpräsentation in RPE Zellen, so dass die Interferon- γ vermittelte Hochregulierung des humanen Leukozyten Antigens (HLA) der Klasse II inhibiert wird (Gabrielian et al., 1994). Einer der wichtigsten Signalwege ist die Expression von FasL in RPE, welcher Apoptose induziert (Jorgensen et al., 1998).

In der Retina befindet sich mit 41% die höchste Dichte von Perizyten im menschlichen Körper (Berrone et al., 2009). Die Anzahl und zahlreichen Funktionen der Perizyten zeigen, dass sie eine sehr große und wichtige Rolle in der Retina spielen. Im Rahmen der diabetischen Mikroangiopathie, des retinalen Venenverschlusses, der Polyzythämie und der Bluthochdruck-Retinopathie kann ein frühzeitiger Verlust von Perizyten beobachtet werden (Imesch et al., 1997; Hammes et al., 2002; Feng et al., 2007). Speziell bei der diabetischen Mikroangiopathie kommt es daher zur Ausbildung von kleinen Aneurysmen, die in deren Verlauf platzen können. Eine Folge der dadurch entstehenden retinalen Blutungen kann eine Erblindung sein. Untersuchungen an kultivierten retinalen Perizyten zeigten die Induktion von Apoptose durch eine schnelle Änderung der Glukosekonzentration und des *highly oxidized-glycolated low density lipoprotein* (HOG-LDL) durch die Aktivierung des MAPKinase-Signalweges (Wu et al., 2008; Diffley et al., 2009). Bei einer arteriellen Hypertonie können bei den Perizyten strukturelle Veränderungen auftreten. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die zerebralen Perizyten hypertensiver Ratten viermal soviel α -smooth muscle-Aktin exprimieren, wie die zerebralen Perizyten normotensiver Ratten (Herman et al., 1988). In retinalen Kapillaren wurden ähnliche Fehlregulationen des Blutdruckes beschrieben (Wallow et al., 1993).

1.3 HCMV-Retinitis

Die opportunistische Infektion des Zytomegalievirus stellt eine der bedeutendsten Erkrankungen bei AIDS- und Transplantationspatienten, die mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt werden, und bei immunsupprimierten Patienten dar. AIDS-Patienten erkranken häufiger an einer HCMV-Retinitis, als andere immunsupprimierte Patienten. Vor Etablierung der HAART (Hochaktive anti-retrovirale Therapie) erkrankten 30% der HIV-infizierten Patienten, deren Blut weniger als 50 CD4+T-Lymphozyten (T-Helferzellen) pro μ l enthielt, an einer HCMV-Retinitis. Seit Mitte der 90er Jahre ist das Auftreten einer HCMV-Retinitis deutlich zurückgegangen. Unter der HAART bleibt das

Immunsystem weitgehend stabil, bzw. kann sich bei vielen Patienten deutlich erholen. Wie bei anderen Herpesviren, kann nach einer HCMV-Primärinfektion eine latente Infektion folgen. Ist das Immunsystem geschwächt, kommt es zur Infektion verschiedener Organe. In Patienten mit AIDS ist in 75-85% der Fälle das Zielorgan die Retina. HCMV erreicht die Retina über eine hämatologische Ausbreitung polymorph nukleärer Leukozyten und Monozyten. Die Virionen können die Blut-Retina Schranke durch Endozytose durchdringen, die retinalen vaskulären Endothelzellen infizieren und sich replizieren. Dies wiederum kann die Intaktheit der Blut-Retina Schranke gefährden und HCMV Zugang zu den Gliazellen und den retinalen Pigmentepithelzellen gewähren. Eine Zerstörung der Retina kann zur Fas/Fas-Liganden (FasL) vermittelten Apoptose führen. Die HCMV infizierten Zellen können die Sekretion von FasL erhöhen. Daraus resultiert das Absterben der umliegenden Zellen durch Apoptose (Chiou et al., 2001). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das „immediate-early gene 2“ (IE2) von HCMV die Expression antiapoptotischer Moleküle aktiviert und so die infizierten Zellen schützt. Die Infektion verbreitet sich zentrifugal über die Retina durch Zell-Zell-Übertragung aus. Mit fortschreitender Retinitis und bei einer zu spät einsetzenden Behandlung kommt es zur ausgeprägten Nekrose. Dies kann zum Einriss der Retina führen, zur Netzhautablösung und schließlich zur Erblindung.

Am Augenhintergrund sind meist peripher gelegene weißliche, granuläre und ödematösen Veränderungen oder Blutungen zu sehen. Charakteristisch ist ein Mischbild aus weißen unscharf begrenzten Flecken (Cotton-Wool-Flecken) und Blutungen mit ischämischen Nekrosen der Netzhaut (Abbildung 1.4).

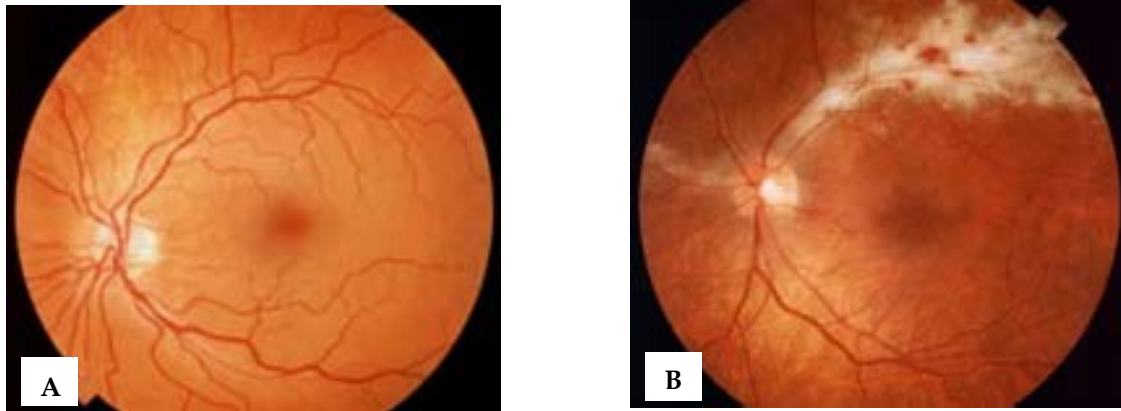


Abbildung 1.4: Ophthalmoskopische Aufnahmen der Retina. (A) In der gesunden Retina sind die retinalen Gefäße deutlich zu erkennen und grenzen sich klar vom Hintergrund ab. (B) In der HCMV-erkrankten Retina sind die typischen Zeichen der Retinitis, wie cotton-wool-Flecken mit Einblutungen und Infiltraten zu erkennen. Des Weiteren sind die Kapillaren und Venolen nicht mehr von Hintergrund abzugrenzen. Quelle: <http://www.eyecenters.com/eye-conditions/aids-and-cmv-retinitis.html>.

Die Behandlung besteht in einer Initialtherapie mit Virustatika, wie Ganciclovir, Foscarnet, Cidofovir, Fomivirsen und Valganciclovir. Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir sind DNA-Polymerase-Inhibitoren, welche die HCMV-Replikation blockieren. Fomivirsen ist ein Antisense-Oligonukleotid, das direkt die IE2 Gen-Transkription blockiert und somit sehr effektiv ist. Die Lokalisation der Infektion am Auge macht eine besondere Therapieform möglich. Hierbei wird ein Implantat in den Glaskörper des Auges eingesetzt, welches kontinuierlich über mehrere Monate den Wirkstoff direkt an der Netzhaut freisetzt. Ein Problem der Therapie stellt die Resistenzentwicklung dar. Eine Virostatika-Resistenz tritt äußerst selten bei Patienten in der Zeit der Diagnose und der antiviralen Therapie auf. Allerdings entwickeln etwa 25% der Patienten in der Zeit vor der HAART, innerhalb eines Jahres nach Therapie, eine Resistenz. Diese entsteht durch Mutationen in den Genen UL97 (kodiert für die Phosphotransferase) und UL54 (DNA-Polymerase). Die Resistenzentwicklung zu HCMV-Virustatika ist mit einem erhöhten Risiko einer fortschreitenden Retinitis, einer Infektion des zweiten Auges und der Erkrankung des äußeren Auges assoziiert (Kedhar & Jabs, 2007).

1.4 Taxonomische Einordnung und die klinische Bedeutung des Humanen

Zytomegalievirus (HCMV)

Das humane Zytomegalievirus gehört zur Familie der Herpesviren (*Herpesviridae*) und konnte bisher bei Tieren und Menschen nachgewiesen werden (Roizman et al, 1992). Namensgebend für die Infektion mit HCMV ist die Vergrößerung der betroffenen Zellen (Zytomegalie: griech. *kytos*: Zelle; *me-gas*: groß) mit charakteristischen Einschlusskörperchen (Weller et al., 1960). Mikroskopisch sind diese Zellen durch charakteristische DNA-haltige intranukleäre Einschlusskörperchen zu erkennen. Die Unterteilung der *Herpesviridae* erfolgte gemäß ihrer unterschiedlichen biologischen Merkmale, wie die Pathogenität, den Wirtszelltropismus und die genetischen Eigenschaften nach der Klassifikation durch die *Herpesvirus Study Group* des *International Committee on Taxonomy of Viruses* in die Subfamilien α -, β -, und γ -*Herpesvirinae* (Roizman & Baines, 1991). Das HCMV gilt als einer der wichtigsten Vertreter der β -*Herpesvirinae*. Es zeigt eine strikte Wirtsspezifität und zeichnet sich durch seinen langsamen Replikationszyklus aus (Ho, 1991; Mocarski, 1993). Das humane Zytomegalievirus kommt in allen Bevölkerungsschichten vor und ist ein ubiquitäres Pathogen. Die Durchseuchung bzw. Seroprävalenz liegt in den Industrieländern bei 50- 60% und in den Entwicklungsländern nahezu bei 100% (Pass, 2001; Mocarski et al., 2007; Söderberg-Naucler et al., 2007). Wie alle Herpesviren, besitzt HCMV die Fähigkeit nach erfolgter Primärinfektion im Wirt lebenslang zu persistieren. Im gesunden Organismus verläuft die Primärinfektion inapparent. Unter bestimmten Bedingungen, wie Stress und systemischen Entzündungen, kann das Virus reaktiviert werden und zu einem ausgeprägten Krankheitsbild, der Mononukleose, führen (Cohen & Corey, 1985; Prösch, 2000; Sisson et al., 2002). In immunsupprimierten Personen, insbesondere Transplantations- und AIDS-Patienten kommt es häufig zu schwerwiegenden klinischen Verlaufsformen bis hin zum Tod (van de Meer, 1996; Mocarski et al., 2007). Ferner werden HCMV onkomulatorische Eigenschaften zugeschrieben. Das bedeutet das Virus kann Tumorzellen infizieren und so deren Malignität erhöhen (Cinatl et al., 2004; Michaelis et al., 2009).

Die Übertragung von HCMV erfolgt durch eine Tröpfcheninfektion oder durch den Kontakt mit infiziertem Blut und kann nahezu in allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Forbes, 1989). Einer der bedeutenden Übertragungswege ist die prä-, peri- und postnatale Infektion von Säuglingen. Durch eine Reaktivierung oder einer Primärinfektion in der Schwangerschaft liegt die intrauterine Übertragung bei ca. 40% (Stagno et al., 1986;

Eggers, 2001). Von den meisten infizierten Säuglingen, weisen 10% Geburtsdefekte, wie Wachstumsstörungen, Taubheit, Mikrozephalie oder Chorioretinitis auf (Demmler, 1991; Peckham, 1991; Damato & Winnen, 2002; Vochem, 2003; Arvin et al., 2004; Malm & Engmann, 2007). Bei Transplantationsvaskulopathien spielt HCMV eine große Rolle. Dabei kommt es durch die Infektion der Endothelzellen zu Abstoßungsreaktionen des Organs (Schlitt et al., 2006).

1.5 Struktur des HCMV

1.5.1 Aufbau des Viruspartikels

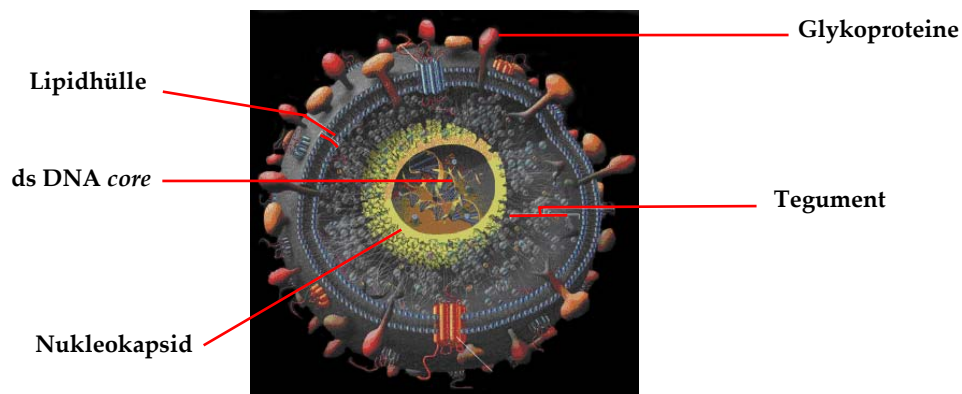


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung eines HCMV-Partikels. Das doppelsträngige DNA (ds DNA)-Genom befindet sich im ikosaedrischen Nukleokapsid, welches von einer amorphen Proteinmatrix, dem Tegument umgeben ist. Die Hülle des Virus besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit zahlreichen verankerten Glykoproteinen. Modifiziert nach Reddehase (2006).

Das 150 bis 200 nm große HCMV-Virion (Abb. 1.5) ist von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in die etwa neun Glykoproteine verankert sind. Das Glykoprotein B gilt als stark konserviert und stellt zudem das wichtigste Antigen der neutralisierenden humoralen Immunantwort dar (Wright et al., 1964; Chang et al., 1989; Spadera et al., 2002). Die darunter liegende amorphe Matrix, welche aus ca. 25 Tegumentproteinen besteht, umgibt das ikosaedrische Nukleokapsid mit der doppelsträngigen linearen DNA. Es kodiert für ca. 200 Proteine und ist mit etwa 230 Kilobasen das größte Genom innerhalb der *Herpesviridae* (Butcher et al., 1998; Chambers et al., 1999; Chen et al., 1999; Mocarski et al., 2007).

1.5.2 Infektionszyklus von HCMV

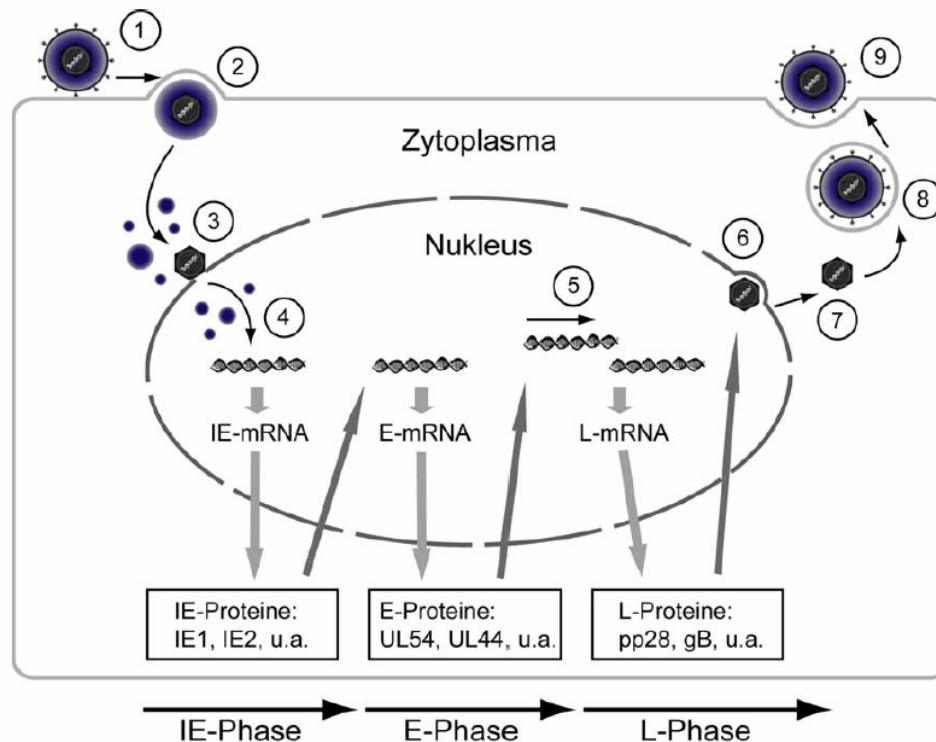


Abbildung 1.6: Infektionszyklus des HCMV. Schritte 1 bis 4 IE- und E-Phase: (1) Adsorption; (2) Fusion mit der Zytoplasmamembran und Freisetzung des Nucleokapsids mit Tegumentproteinen ins Zytoplasma; (3) Andocken des Kapsids an den Kernporenkomplex; (4) Freisetzung der DNA, Beginn der kaskadenartigen Genexpression; (5) Replikation der DNA und Einsetzen der L-Phase; (6) Knospung an der inneren Kernmembran in den perinukleären Raum → erste Hüllmembran; (7) Freisetzung an der äußeren Hüllmembran unter Verlust der Hülle; (8) Finale Behüllung an Membranen des ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC); (9) Freisetzung des reifen Viruspartikels über Exozytose. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Krauss, S. (2007).

HCMV kann ein weites Spektrum an Zellen infizieren. Die Infektion ist dabei abhängig von den viralen Hüllproteinen und den zellulären Rezeptoren (Gicklhorn et al., 2003). Der initiale Schritt der Infektion und somit Beginn des Infektionszyklus (siehe Abbildung 1.6) und die Adsorption des Virus an die Wirtszelle basiert auf der Interaktion des Glykoproteinkomplexes gCI sowie dem gCII mit dem zellulären Heparansulfat-Proteoglykanen (Deepak et al., 2001). Diese unspezifische Bindung bedingt eine Wechselwirkung zwischen dem Glykoprotein B und einem bislang nicht eindeutig identifizierten Rezeptor. Diesbezüglich wurden unter anderem der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) sowie Integrine ($\alpha\beta3$, $\alpha2\beta1$, $\alpha6\beta1$) als Korezeptoren diskutiert (Wang et al., 2003 und 2005; Isaacson et al., 2007). Bereits kurz nach der Anhaftung des Virus an die

Zielzelle kommt es zur Fusion mit der Zytoplasmamembran (Bold et al., 1996; Lopper & Compton, 2004). Dadurch gelangt das freigesetzte Nukleokapsid zusammen mit den Tegumentproteinen in das Zytoplasma der Wirtszelle. Das virale Genom wird über das zelluläre Mikrotubuli-Netzwerk zum Zellkern transportiert (Roizman et al., 2001; Ogawa-Goto et al., 2003). Im Zellkern erfolgt die Transkription viraler Gene mit Hilfe der zellulären RNA Polymerase II (Thomsen et al., 1984). Bei allen Herpesviren ist die kaskadenartige Genexpression zeitlich reguliert und lässt sich in drei Phasen unterteilen: eine „sehr frühe“ α - (*immediate-early*, IE), eine „frühe“ β - (*early*, E) und eine „späte“ γ -Phase (*late*, L) (Stinski et al., 1991; Mocarski, 1996).

Ist das virale Genom ins Nukleoplasma gelangt, erfolgt die Expression der IE-Gene, die auf vier verschiedenen Regionen des HCMV Genoms verteilt sind: UL36-37, UL122-123 (IE1 und IE2), US3 sowie TRS1 und IRS1 (Mocarski et al., 2007). Die ersten viralen Proteine die in der Zelle synthetisiert werden, werden von den IE-Genen kodiert. Diese regulieren die Transkription der nachfolgenden Gene durch Beeinflussung der viralen und zellulären Promotoren (Spector, 1996). Die Expression der IE1/IE2-Gene unterliegt der Kontrolle des starken *major* IE-Promotors (MIEP) und dessen Enhancers (Stinski & Meier, 2007). In der daran anschließenden E-Phase erfolgt die Synthese von Proteinen, welche für die DNA Replikation benötigt werden (McVoy & Adler, 1994; Lou & Fortunato, 2007). Etwa zeitgleich beginnt die L-Phase des Infektionszyklus. In dieser Phase werden Gene exprimiert, die hauptsächlich für Strukturproteine kodieren aber auch für Regulatoren der Kapsidreifung und der DNA-Verpackung (Mocarski et al., 2007). Die Morphogenese des Viruspartikels findet im Kern der Wirtszelle statt. Nach der Neusynthese der DNA durchqueren die Nukleokapside die Kernmembran und werden temporär umhüllt (Radsak et al., 1989; Gibson, 2006). Im weiteren Verlauf der Reifung verlieren die Kapside ihre erste Hülle und gelangen ins Zytoplasma der Wirtszelle (Radsak et al., 1990 & 1995). Die endgültige Umhüllung der Kapside findet an den Zisternen des Endosoms oder dem *trans*-Golgi-Netzwerks statt (Tooze et al., 1993; Radsak et al., 1996; Britt, 2006). An den Membranen werden virale Glykoproteine inseriert und die reifen Viruspartikel exozytotisch freigesetzt (Radsak et al., 1996; Mettenleiter, 2002).

1.5.3 Antivirale Antwort der Zelle

Bereits bei Zytomegalievirus-Zellkontakt werden Transkriptionsfaktoren, wie c-Fos/c-Jun, Myc, ATF/CREB, C/EBP, SREB, NF-1, NF- κ B, SP-1, aber auch Signalkaskaden, wie z.B. die Phosphoinositol-3-Kinase und MAP-Kinase aktiviert. Eine weitere Antwort der Zelle auf HCMV-Partikel ist der Anstieg Interferon stimulierter Gene, wie Interferon- β und inflammatorischer Zytokine sowie Adhäsionsmolekülen (Zhu et al., 1998; Yurochko & Huang, 1999; Brown et al., 2001; Detrick et al., 2001 & 2010; Simmen et al., 2001). Zu den Zytokinen gehören u. a. Monokine, Wachstumsfaktoren (v. a. GM-CSF, G-CSF), chemotaktische Peptide (Chemokine), Interferone (IFN) und Interleukine (IL). Chemokine sind lösliche, diffusionsfähige kleine Moleküle, welche die Zielzelle durch Interaktion spezifischer Membranrezeptoren aktivieren. Dabei unterscheidet man zwischen der CC- und der CXC-Chemokinfamilie. Die CC-Chemokine besitzen zwei benachbarte Cysteine in der Nähe des Amino-Terminus, wohingegen die zwei Cysteine der CXC-Chemokine durch eine andere Aminosäure getrennt sind.

Zu den inflammatorischen Zielzellen zählen neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten. Chemokine spielen somit eine wichtige Rolle während der Wundheilung, Infektion und/oder Inflammation (Miller et al., 1992; Luster, 1998; Rossi et al., 2000). Bei einer Virusinfektion sind Chemokine und ihre Rezeptoren unabdingbar für die Immunabwehr. Sie erhöhen die zytotoxische Aktivität der infizierten Zellen und blockieren den Viruseintritt (Salazar-Mather et al., 2000; Chiou et al., 2001; Mahalingsam et al., 2001; Mogensen et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die Chemokine CXCL-8 (*C-X-C motif ligand 8* oder Interleukin 8) und CCL5 (*C-C motif ligand 5* oder Rantes) in HRPE sowie humanen Vorhautfibroblasten (HFF) während einer HCMV-Infektion hochreguliert werden. Dagegen werden CCL2 (MCP-1) und CCL3 (MIP-1a) herunterreguliert (Cinatl et al., 2000; Momma et al., 2003). Auch eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1), VCAM-1 (vaskuläres Adhäsionsmolekül 1), ELAM-1 (endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül 1) und LFA-1 (Leukozyten-Funktionsantigen 1) konnte während einer HCMV-Infektion nachgewiesen werden (Span et al., 1991; Ito et al., 1995; Nagineni et al., 1996; Cinatl et al., 2000). Dabei wird die Induktion des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch die IE-Proteine hervorgerufen (Grundy et al., 1993; Burns et al., 1999; Dengler et al., 2000; Chan et al., 2004). In infizierten Zellen führt eine erhöhte Expression von ICAM-1 zur Adhäsion inflammatorischer Zellen, welche so ins umliegende

Gewebe gelangen und die Zellen empfindlich für die NK-Zell-Lyse (Natürliche Killerzellen) machen (Fletcher et al., 1998; Lanier, 2008). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass monoklonale Antikörper gegen ICAM-1 die NK-Zellen vermittelte Lyse HCMV-infizierter Fibroblasten blockieren (Leong et al., 1998). Die gesteigerte Expression an ICAM-1 nach einer HCMV-Infektion sowie LFA-1 scheinen dabei eine wichtige Funktion in der NK-Zell vermittelten Immunantwort zu übernehmen (Timonen et al., 1988; Grundy & Downes, 1993). So wird angenommen, dass auf diese Weise im transplantierten Organ eine Abstoßungsreaktion durch die Immunzellen des Spenders ausgelöst wird, was durch den Nachweis einer verstärkten Expression von ICAM-1 in infiziertem Gewebe belegt wird (Waldman, 1998; Lautenschlager et al., 2006).

1.5.4 Die Immediate Early Proteine IE1 72 kDa und IE2 86 kDa

Für die transaktivierenden *immediate early*-Proteine des humanen Zytomegalievirus sind bisher vier Genomregionen bekannt, die sehr früh aktiviert werden. Die IE1/2-Region steht unter Kontrolle eines Enhancers der durch zelluläre Transkriptionsfaktoren wie AP-1 aktiviert wird. Durch differentielles Spleißen entstehen die IE-Transkripte, welche für die IE1- (72kDa) und IE2-Proteine (86kDa) kodieren (Mocarski et al., 2007). Das am meisten gebildete IE1-Protein wird von einer mehrfach gespleißten mRNA aus den Exonen 2 bis 4 und IE2 aus den Exonen 2, 3 und translatiert. Das IE1-Protein erhöht die Expression des zellulären Transkriptionsfaktors NF- κ B und verstärkt dessen Aktivität. Ferner bildet IE1 mit NF- κ B einen Komplex, induziert seine eigene Expression und die der späten Gene. Mit seiner Funktion als Transaktivator kann IE1 neben viralen Genen auch zahlreiche zelluläre Gene aktivieren (Mocarski et al., 2007). Das Ausmaß der Aktivierung ist dabei zelltypabhängig und scheint mit den Interaktionen subnukleärer Strukturen im Zusammenhang zu stehen (Castillo & Kowalik, 2002). Des Weiteren erhöht IE1 durch Aktivierung viraler Gene und der viralen Replikation, die Wirksamkeit von IE2 (Greaves & Mocarski, 1998; Gawn & Greaves, 2002). Für das virale Wachstum in Zellkultur mit einer niedrigen M.O.I. (*Multiplicity of infection*) ist IE1 unabdingbar. Es ist bekannt, dass IE1 mit dem Wirtschromatin und zellulären Proteinen interagiert, aber nicht direkt an die DNA bindet. Bisher ist unklar, wie IE1 zelluläre Promotoren aktiviert. Es konnte aber eine Assoziation von IE1 mit dem TATA-Box assoziierten Faktoren (TAFs) und Transkriptionsfaktoren (wie z.B. SP-1, E2F-1, CTF-1) gefunden werden (Hayhurst et al, 1995; Margolis et al, 1995;

Lukac et al, 1997). IE1 allein bindet an TATA-Box-lose Promotoren, dadurch kommt es zur Aktivierung der DNA-Polymerase α , c-Fos, c-Myc und dem Dihydrofolatreduktase-Promotor (Cherrington & Mocarski, 1989). Die Phosphorylierung der Retinoblastoma-Proteine Rb-107, Rb-103, den E2F-Transkriptionsfaktor-Familienmitgliedern und PML durch IE1 führt zu verschiedenen zellulären Antworten auf die Virusinfektion (Pajoviv et al, 1997; McElroy et al., 2000). Konstitutive Promotorsequenzen, welche die TATA-Box enthalten, sind ausreichend, um eine Transaktivierung von HIV-LTR, HSP70, c-Fos und c-Myc-Promotoren durch IE1 und IE2 hervorzurufen. Während IE1 die virale Genexpression verstärkt, wirkt IE2 autoregulativ auf seine eigene Expression und der Expression von IE1 entgegen (Pizzoro & Hayward, 1990; Cherrington et al, 1991). IE2 interagiert aber auch mit zellulären Transkriptionsfaktoren, es bildet sich der so genannte *host transcription complex*, welcher aus der RNA-Polymerase II, Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren besteht. Dieser aktiviert die Genexpression verschiedener zellulärer Gene, wie z.B. Chemokine und Interferone (Lukac et al, 1994; Lang et al, 1995; Bryant et al, 2000; Hofmann et al, 2000). Einen wichtigen Unterschied zu IE1 stellt die direkte Bindungsfähigkeit von IE2 an zelluläre Promotoren dar, dabei bindet IE2 an die „*consensus IE2-binding-site*“ (IBS), welche die TATA-Box vieler zellulärer Gene beinhaltet (Wang et al, 2000). Die Mechanismen, mit welchen IE2 zugunsten der Virusvermehrung agiert, wie z. B. durch die Aktivierung der zellulären Genexpression, Inhibierung von Interferon- β , Zytokinen und pro-inflammatorischen Chemokinen ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt (Taylor & Bresnahan, 2006). RPE bilden die äußere Blut-Retina Schranke, es werden während einer HCMV-Infektion nur geringe Mengen IE-Proteine gebildet und der Replikationszyklus des Zytomegalievirus ist verlangsamt. Bisher ist unbekannt, ob retinale Perizyten, welche die innere Blut-Retina Schranke bilden, bei einer HCMV-Retinitis involviert sind. Die Untersuchung der Perizyten bezüglich einer HCMV-Infektion, der IE-Expression, des Replikationszykluses und immunprivilegierter Eigenschaften, könnten Aufschluss über mögliche und neue Behandlungsstrategien für eine HCMV-Retinitis geben.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die HCMV-Retinitis stellt eine der bedeutendsten Infektionen bei immunsupprimierten Patienten dar. Bei einer Reaktivierung der HCMV-Infektion kommt es durch inflammatorische Prozesse zur Entzündung der Retina, welche mit einem starken Sehverlust verbunden ist und zur Erblindung führen kann.

Humane Vorhautfibroblasten (HFF) sind ein etabliertes Zellkulturmodell zur Untersuchung der HCMV-Infektion. Sie lassen sich sehr gut mit dem Zytomegalievirus infizieren und stellen durch die hohe Virusproduktion eines der wichtigsten *in vitro* Zellsysteme zum Studium der viralen Genexpression und Virusmorphogenese dar (Compton, 1993). Als Modellsystem für eine HCMV-Retinitis *in vitro* dienen bisher humane retinale Pigmentepithelzellen (RPE). Im Vergleich zu Fibroblasten, läuft der virale Replikationszyklus in RPE-Zellen zeitlich verzögert ab (Adair, 2006; Detrick, 2010). Es werden geringere Mengen viraler IE-Proteine exprimiert, und die wenigen infizierten Zellen zeigen erst nach einer sehr langen Inkubationszeit einen zytopathischen Effekt (CPE). Diese Eigenschaften könnten im Bezug auf die virale Persistenz und die Aktivierung in der Retina eine wichtige Rolle spielen. Für die Infektion mit HCMV können weitere Zellen relevant sein, wie die humanen retinalen Perizyten (HRP). Im Vergleich zur Verteilung und Anzahl der Perizyten im gesamten Körper, befindet sich an den Gefäßen der Retina die größte Ansammlung dieses Zelltyps (40%). Sie stabilisieren die Mikrogefäße und bilden die innere Blut-Retina Schranke (BRS). Somit könnten retinale Perizyten, während einer HCMV-Retinitis von großer Bedeutung sein. Bisher wurden die Schädigung, der Verlust von Perizyten und die damit verbundene Zerstörung der retinalen Gefäße während einer diabetischen Retinopathie beschrieben. Es ist bekannt, dass es bei einer HCMV-Retinitis auch zu Mikrovaskulopathien und einer starken Periphlebitis mit Einblutungen und Zerstörung der Gefäße kommt. Über die Auswirkung einer Infektion in Perizyten durch HCMV und der damit verbundenen Retinitis war bisher noch nichts bekannt. Ziel dieser Arbeit war, humane retinale Perizyten zu isolieren und zu untersuchen, ob sie bei der HCMV-Retinitis eine Rolle spielen und so ein mögliches Zellmodell zur Untersuchung der HCMV-Retinitis zu etablieren. Zunächst sollten aus Spenderaugen die Retinae präpariert, die humanen retinalen Perizyten (HRP) aus deren Gefäßen isoliert und diese in Kultur genommen werden. Ferner sollten für die isolierten HRP die optimalen Kultivierungsbedingungen etabliert

werden und die Homogenität der isolierten HRP mittels immunhistochemischer Färbung spezifischer Proteine identifiziert und charakterisiert werden. Durch den Nachweis der viralen IE- und *late*-Proteine auf transkriptioneller und translationeller Ebene, sollte die Infizierbarkeit der HRP mit HCMV und dessen Replikationszyklus in diesen Zellen analysiert werden. Des Weiteren sollten die Titer der infizierten HRP bestimmt werden und mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen HCMV-Viruspartikel in verschiedenen Stadien nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass bei einer HCMV-Retinitis inflammatorische Prozesse in der Retina ausgelöst werden. So sollte mittels Genexpressionsstudien die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (p50/p65), die Sekretion verschiedener Chemokine und Interleukine in infizierten HRP und die ICAM-1-Expression mittels Adhäsionsstudien untersucht werden. Ferner sollte der Einfluss von EGF-R und spezifischer Integrine bezüglich der HCMV-Adsorption analysiert werden. Weiterhin sollte mithilfe Promotoranalysen für Chemokin-/Interleukingene und des Adhäsionsproteins ICAM-1 im Luciferase-Reportergenassays der Einfluss von HCMV und dessen viraler Proteine IE1 und IE2 untersucht werden.

Die Ergebnisse sollen neue Therapieansätze zur Behandlung einer HCMV-Retinitis ermöglichen. Bisher werden Medikamente zur Behandlung der HCMV-Infektion eingesetzt, die direkt auf das Virus wirken. Gegen diese Medikamente werden oft Resistenzen entwickelt und sie haben eine Vielzahl von Nebenwirkungen. Eine mögliche und neue Behandlungstrategie könnte eine Kombinationstherapie aus Virostatika und antiinflammatorischen Medikamenten darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller, Ort
Autoklav	Systec V-150, Systec GmbH
Brutschränke	Sanyo Electric Biomedical Co. Ltd., Japan Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACS CantoII	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eismaschine	Scotsman, Mailand, Italien
Fluoreszenzmikroskop IX 71	Olympus Optical Co., Hamburg
Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus Optical Co., Hamburg
Gelelektrophoreseapparatur	Bio Rad, München
Hamilton-Pipette	Hamilton GmbH, Darmstadt
Heizblock Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Horizontalschüttler	New Brunswick Scientific Edison, N.J.,USA
Hyperkassette	Amersham GmbH, Freiburg
Magnetrührer	Janke und Kunkel KG, Staufen
Mikroplatten Reader Infinite 200	Tecan, Crailsheim
Millipore H ₂ O-Anlage	Millipore, Eschborn
Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell	Bio-Rad GmbH, München
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad GmbH, München
PCR Thermocycler, Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop CKX41	Olympus Optical Co., Hamburg
pH-Meter inoLab pH 730	WTW GmbH, Weilheim
Photometer, NanoDrop	Thermo SCIENTIFIC, Wilmington, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson/Abimed, Langenfeld Starlab, Ahrensburg
Pipettierhilfen	Integra Biosciences, Fernwald
Real-Time Thermocycler 7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sicherheitswerkbank	Kendro, Langenselbold
Vortex Geräte Vortexer REAX top Vortexer REAX 2000 Vortex Mixer	Heidolph Instruments, Kelheim Velp Scientifica, Italien
Waagen Laborwaage Kern 770 Analysenwaage Kern 440-47N	KERN & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Zentrifugen Mikro 200R Rotixa 50RS Rotanta 460R Avanti J-26 XP Eppendorf Zentrifugen 5417C und 5417R	Hettich, Tuttlingen Beckman Coulter GmbH, München Eppendorf, Hamburg

Material	Hersteller, Ort
Allzweckbecher	Greiner, Frickenhausen
Chirurgisches Einmalskalpell, steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Cryotubes	Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten, steril	Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldenburg Eppendorf, Hamburg Greiner, Frickenhausen Starlab, Ahrensburg
Einmalspritzen, steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
FACS-Röhrchen	Falcon, Heidelberg
Filterpapier (für Western Blot)	Bio-Rad GmbH, München
Glasflaschen	Schott, Mainz Biochrom AG, Berlin
Hyperfilm ECL	Amersham GmbH, Freiburg
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kryobox (Einfrierbehälter)	Nunc, Roskilde, Dänemark
MicroAmp Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Weiterstadt
MicroAmp Optical 96-well plates	Applied Biosystems, Weiterstadt
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham GmbH, Freiburg
Petrischalen	BD Biosciences, Heidelberg
PS-Röhrchen, 14 ml	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsröhrchen	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Nunc, Roskilde, Dänemark
Stripetten	Costar, Baar
Zellkulturgefäße	Greiner, Frickenhausen Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellsieb	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.2 Kommerzielle Kits

Kommerzielle Kits	Hersteller, Ort
Calcium-Phosphat Transfection Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega, Madison, USA
Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
High Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Nuclear Extract Kit	Active Motif, California, USA
PeqGold Total RNA Kit	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

Kommerzielle Kits	Hersteller, Ort
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Plasmid Mini, Midi, Maxi Kit	Qiagen, Hilden
TransAM NFκB p65 und p50 Chemi	Active Motif, California, USA
HIV-1 p24 Antigen ELISA	ZeptoMetrix, New York
DuoSet ELISA Development Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Chemikalien und Medien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders im Text vermerkt, von folgenden Anbietern in p.a. Qualität bezogen.

Chemikalien	Hersteller, Ort
Aceton	J.T. Baker, Deventer, NL
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
3-Amino-9-ethylcarbazol	Sigma-Aldrich, München
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Agarose, electrophoresis grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen Molecular biology grade; Eppendorf, Hamburg
Ammoniumperoxodisulfat	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Ampicillin	Sigma - Aldrich, München
Bovines Serumalbumin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Blasticidin S-HCL	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol)	Merck, Darmstadt
Dextrose	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
DMEM without Phenol red	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMEM-D-Valin	PAA, Pasching Österreich
DMEM-HAM's F12 Flüssigmedium	Biochrom AG, Berlin
DNA-Größenstandard	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
ECL Western Blotting Substrat	Pierce, Rockford
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol absolut	Fluka, Buchs, Schweiz
Fixierer	Tetenal AG & CO. KG, Norderstedt
Fötales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, München

Chemikalien	Hersteller, Ort
Glukose	Sigma - Aldrich, München
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycogen (20 mg/ml)	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Humanes Serum	Blutspendedienst Frankfurt am Main
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium)	Biochrom AG, TX 046-10, Berlin
Isopropanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin-Sulfat	Sigma - Aldrich, München
Laemmli-puffer	Bio - Rad GmbH, München
L-Glutamin	Sigma -Aldrich, München
Lipofectamine™2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma - Aldrich, München
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Riedel de Haën, Seelze
Natriumchlorid	Sigma - Aldrich, München
Natriumdodecylsulfat	Sigma - Aldrich, München
Natriumfluorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat, Bicarbonat)	Sigma-Aldrich, München
NaH ₂ PO ₄ (Natriumhydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
NaPPi (tetra-Natriumdiphosphat-decahydrat)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix (100 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
OptiMEM-Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin Penicillin Streptomycin	Grünenthal, Stolberg Sigma-Aldrich, München
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Polybren (1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylene polymethobromid)	Sigma-Aldrich, München
Pre-Developed TaqMan Assay Reagent	Applied Biosystems, Weiterstadt
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
RNase AWAY	Molecular Bio Products Inc., San Diego, USA
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Weiterstadt
TaqMan Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Tetramethylethyldiamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller, Ort
Thimerosal	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)	Sigma-Aldrich, Seelze
Tris Base	Sigma-Aldrich, Seelze
Tris Hydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin: Titriplex III Ethylendinitrilotetraessigsäure - Dinatriumsalz-Dihydrat, EDTA-Na	Sigma-Aldrich, München Merck Serono, Darmstadt
Trypton	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Merck – Schuchardt, Hoherbrunn
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, München

2.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller, Ort
DNaseI (1U/ μ l), amplification grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
KpnI-HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
EcoRI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
MluI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
NheI-HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
XhoI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Pfx Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pfu Polymerase	Stratagene, USA
Prestained Protein Marker (Broad Range)	NEB BioLabs GmbH, Frankfurt
RNase A (10mg/ml)	Sigma, Taufkirchen
T4-DNA Ligase (1000 U/ml)	NEB BioLabs GmbH, Frankfurt

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.1.1: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
α -smooth muscle Aktin, rabbit	1:200	Abcam, Cambridge, UK
smooth muscle Myosin, mouse	1:400	Biocompare, Heidelberg
non-smooth muscle Myosin, rabbit	1:200	Acris Antibodies GmbH, Herford
Anti-Desmin, rabbit	1:200	Acris Antibodies GmbH, Herford
Anti-Vimentin, rabbit	1:200	antibodies-online, GmbH, Aachen
Von Willebrand Faktor, mouse	1:100	Abcam, Cambridge, UK
CD31, mouse	1:200	Abcam, Cambridge, UK
Anti-human CD3, mouse	1:500	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-human ICAM-1, sheep	25 μ g/ml	R&D Systems,
Anti-human Integrin beta 2 (LFA-1), m	25 μ g/ml	Millipore GmbH, Schwalbach, Ts.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-human Integrin $\alpha\beta3$, <i>mouse</i>	1:20	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-human Integrin αv , <i>mouse</i>	unverdünnt	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-human Integrin $\alpha6\beta1$, <i>mouse</i>	1:20	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-human Integrin $\alpha2\beta1$, <i>mouse</i>	1:20	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-EGFR, <i>mouse</i>	1:20	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-CMV 76 kDa IE, <i>mouse</i>	1:1000	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln
Anti-CMV Glycoprotein B, <i>mouse</i>	1:500	GeneTex, Inc., San Antonio, USA
Anti-NF κ B p50, <i>mouse</i>	1:250	Abcam, Cambridge, UK
Anti-NF κ B p65, <i>mouse</i>	1:250	Abcam, Cambridge, UK
DAPI	1:50	Merck, Darmstadt
Biotin-SP konjugiert	1:1000	Jackson Immuno Research
F(ab') Fragment Anti-Maus IgG		Laborities, West Grove USA
Streptavidin Peroxidase konjugiert	1:3000	Calbiochem, Darmstadt
Goat-anti-mouse PE konjugiert	unverdünnt	BD Biosciences, Heidelberg
Goat-anti-mouse FITC konjugiert	1:80	BD Biosciences, Heidelberg
Goat-anti-mouse Texas Red konjugiert	1:1000	BD Biosciences, Heidelberg
Anti- β -Aktin, <i>mouse</i>	1:5000	Sigma-Aldrich, München
SP-1 (H-225), <i>rabbit</i>	1:500	Santa Cruz Biotechnology, USA
c-Jun (H-79), <i>rabbit</i>	1:200	Santa Cruz Biotechnology, USA

2.1.6 Plasmide

pMDLg/pRRE:	beinhaltet das HIV1 gag- und pol-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors (Dull et al., 1998)
pRSV-Rev:	beinhaltet das HIV1 rev-Gen unter Kontrolle des RSV-Promotors (Hope et al., 1990; Dull et al., 1998)
pHCMV-VSV-G:	beinhaltet die kodierende Sequenz für das Hüllprotein VSV-G des Vesikulären Stomatitis Virus (Beyer et al., 2002)
LeGO-piG2-BSD:	beinhaltet das Gen, welches für das Green Fluorescent Protein (GFP) kodiert, sowie das Blasticidin-S-Deaminase Gen (BSD) (Weber et al., 2008)
LeGO-piG2-BSD-IE1	beinhaltet das Gen für das virale <i>immediate early protein 1</i> , wurde von Hr. Dr. J. Otte (Kinderkrebsstiftung Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt

LeGO-piG2-BSD-IE2	beinhaltet das Gen für das virale <i>immediate early protein 2</i> , wurde von Hr. Dr. J. Otte (Kinderkrebsstiftung Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt
pCGN	eukaryotischer Expressionsvektor, Leervektor, bereitgestellt von Christina Paulus (Universität Regensburg)
pCGN-IE1	eukaryotischer Expressionsvektor, beinhaltet HCMV UL123, bereitgestellt von Christina Paulus (Universität Regensburg)
pCGN-IE2	eukaryotischer Expressionsvektor, HCMV 122, bereitgestellt von Christina Paulus (Universität Regensburg)
Luciferase Reporter Vektoren:	
pGL3-Basic	<i>firefly</i> Luciferase Reporter Vektor, enthält keine SV40 Promotor und Enhancer Sequenzen (verwendet für die Einklonierung der Inserts) (Promega, Madison, USA)
pGL3-Control	<i>firefly</i> Luciferase Reporter Vektor, enthält SV40 Promotor und Enhancer Sequenzen (Promega, Madison, USA)
pRL-SV40	<i>renilla</i> Luciferase Reporter Vektor, interner Kontroll-Reporter Vektor (Promega, Madison, USA)

2.1.7 Primer und Sonden

Tabelle 2.1.2: TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Weiterstadt).

Gen	Kitnummer
18s RNA	Hs99999901_s1
IL-6	Hs00174131_m1
CCL2 (MCP-1)	Hs00611257_m1
CCL5 (RANTES)	Hs00174575_m1
ICAM-1	Hs00164932_m1
α -smooth muscle Aktin (ACTA2)	Hs00909449_m1

Tabelle 2.1.3: Selbst erstellte Primer und Sonden für qRT-PCR.

Gen	Primer Sequenz (5'-3') <i>forward</i> (Operon, Köln)	Primer Sequenz (5'-3') <i>reverse</i> (Operon, Köln)	Sonde Sequenz (AppliedBiosystems)
IE1	GCC GCA CCA TGT CCA CT	CAA CGA GAA CCC CGA GAA AG	VIC-CCT TAA TCT GTT TGA CGA GTT
IE2	CTC GCT ATC AGA CAA CGA GAA CCC	GAT CAC GAT ACA GCG AGA AAG	VIC-CTC GGG CTT GAT GTC TTC CTG
IL-8	AAG GAA CAA TCT ACA TGT GTG TAA AC	CGC AGT GTG GTC CAC TCT CA	VIC-TGA CTT CCA AGC TGG CCG TGG C

Gen	Primer Sequenz (5'-3') <i>forward</i> (Operon, Köln)	Primer Sequenz (5'-3') <i>reverse</i> (Operon, Köln)	Sonde Sequenz (AppliedBiosystems)
CXCL10	GAG CCT CAG CAG AGG AAC C	GAG TCA GAA AGA TAA GGC AGC	SYBR <i>Green</i>

Tabelle 2.1.4: Primer zur Herstellung der PCR-Konstrukte.

Gen	Primer Sequenz <i>reverse</i> (5'-3')
CCL2	CGA CGC GTG AAT GAA GGT GGC TGC TAT GAG CAG
CCL5	CTA GCT AGC CAG ATG CAG GAG CGC AGA GGG CAG TAG
CXCL10	CCG CTC GAG GAA TGC CAC TTA GAG TCA GAA AGA TAG
IL-8	CCG CTC GAG TTC ACA CAG AGC TGC AGA AAT CAG GAA
ICAM-1	CGA CGC GTG AAC AGA GCC CCG AGC AGG ACC AGG AGT

Gen	Primer Sequenz <i>forward</i> (5'-3')
CCL2 -98/+55	GGG GTA CAA TAA GAG GCA GAG ACA GCA GCC AG
CCL2 -200/+55	GGG GTA CAC AGG ATG CTG CAT TTG CTC AGC AG
CCL2 -580/+55	GGG GTA CAC AAT CCT ACA GTT CTG CTA GGC TTC
CCL2 -1355/+55	GGG GTA GAG GCA GTG GGC TAG GAG AAT CGA G
CCL2 -2522/+55	GGG GTA GTC TGA TAT ATG CAA AGG CCA AGT C
CCL5 -72/+67	GGG GTA GGC TCA CTG CAA GCT CCA CCT CC
CCL5 -185/+67	GGG GTA TCC ACC ATT GGT GCT TGG TCA AAG AG
CCL5 -358/+67	GGG GTA GAA TAA GCA GGA ACT TTG AAG ACT C
CCL5 -1167/+67	GGG GTA GAG TGA GGG CAA CTG GGT TCT GAT C
CXCL10 -106/+ 58	GGG GTA GCT TTG CAG ATA AAT ATG GCA CAC TAG
CXCL10 -287/+ 58	GGG GTA GAA AGT GAA ACC TAA TTC ACT ATT AC
CXCL10 -499/+ 58	GGG GTA AAT CAG GCA CAA CTT GCT GTT AC
CXCL10 -2374/+ 58	GGG GTA GTG TCC ATC AAC AAG AAA CAA ACT GAT ATG
IL-8 -76/+63	GGG GTA ACA GCA GAG CAG ACA AGC TTC TAG
IL-8 -132/+63	GGG GTA TAG GGT GAT GAT ATA AAA AGC CAC
IL-8 -440/+63	GGG GTA CAT GAT CTT GTT CTA ACA CCT GCC ACT C
IL-8 -692/+63	GGG GTA GAA CTG ATT TCT ATG TGA AGC ACA TG
IL-8 -2343/+63	GGG GTA CGA GGT GTC TAT GTA AGT TGG GCT CAC
ICAM-1 -81/+ 63	GGG GTA CAG GTG GCT AGC GCT ATA AAG GAT C
ICAM-1 -125/+ 63	GGG GTA GAA GGC GCG AGG TTT CCG GGA AAG CAG
ICAM-1 -331/+ 63	GGG GTA GTG TAG ACC GTG ATT CAA GCT TAG CCT G
ICAM-1 -716/+ 63	GGG GTA GTG TAG AGA GAG GAC GCC GAT TTC
ICAM-1 -1509/+ 63	GGG GTA GAG CTC AGT GGA ACC CGC CCG AGG AAG

2.1.8 Zelllinien

- Humane Retinale Perizyten (HRP)
- Humane Retinale Pigment-Epithelzellen (RPE)
- Humane Vorhaut-Fibroblasten (*human foreskinfibroblasts*, HFF)
- Humane Endothelzellen der Nabelschnur (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC)
- Humane embryonale Nierenepithelzelle 293T
- Affen-Nieren-Fibroblasten der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*, *origin-defective SV-40*, Cos-7)
- Humane T-Zelleukämie Zellen (JURKAT-Zellen)
- Humane Fibrosarkomzellen HT1080

Bei HRP, RPE und HUVEC handelt sich um Primärzellen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit am Universitätsklinikum Frankfurt aus Spenderaugen bzw. Nabelschnüren isoliert wurden. HFF lagen als etablierte primäre Zelllinie vor, die bei Bedarf aus der Kryokonservierung aufgetaut und bis Passage 15 verwendet wurden. Die Zelllinien 293T und Cos-7 wurden von ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) bezogen. Die JURKAT-Zellen und die HT1080 wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) bezogen.

2.1.9 Bakterienstämme

- JM109 *competent cells*, Promega (Madison, USA)

Genotyp: *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1, supE44*, Δ (*lac-proAB*), [*F'* *traD36, proAB, lacI^qZAM15*]

- One Shot TOP10 *chemically competent E.coli*, Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

Genotyp: *F-mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZAM15* Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

2.1.10 Virusstämme

- HCMV-Hi91
- HCMV-AD169

In dieser Arbeit wurden die Laborstämme Hi-91 und AD169 verwendet. Hi-91 ist ein Eigenisolat des Universitätsklinikums Frankfurt am Main aus dem Urin eines Kindes. AD169 ist ein Laborstamm, der ursprünglich von Rowe isoliert wurde (Rowe et al., 1956).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Präparation humaner retinaler Perizyten (HRP) und retinaler

Pigmentepithelzellen (RPE) aus menschlichen Augen

Dispase-Kollagenase-Gemisch: 0,02% (w/v) Kollagenase (172 U/mg)
10% (w/v) Dispase (2,4 U/mg)
in 1 x PBS lösen und steril filtrieren

IMDM Medium für HRP: 15% (v/v) FCS
5% (v/v) humanes Serum
2,7 mM Na-Bicarbonat
0,4 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
10 mg/ml Streptomycin
2,5 ng/ml bFGF

IMDM Medium für RPE: 10% (v/v) FCS
3,6 mM Na-Bicarbonat
0,4 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin
10 mg/ml Streptomycin

Zur Gewinnung humaner retinaler Perizyten wurden Spenderaugen verwendet, die maximal 48 h nach der Entnahme von der Augenklinik des Universitätsklinikums der Goethe Universität zur Verfügung gestellt wurden. Unter sterilen Bedingungen wurden die Augen zunächst mittels Kompressen gesäubert. Mithilfe von Einmalskalpellen, Pinzetten und Präparationsscheren wurden aus den Augen die Retinae und Choroideae für die HRP bzw. RPE-Isolierung freipräpariert und in separate Petrischalen mit 1 x PBS überführt. Im Anschluss wurden die in 1 x PBS aufgenommenen gefäßreichen Regionen der Retina mit einem sterilen Dounce-Glashomogenisator zerkleinert, in einem Kollagenase/Dispase-Gemisch (siehe oben) aufgenommen und kräftig gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C und stetigem Schütteln wurde das Gemisch durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb (BD Biosciences, Mexiko), welches auf ein Falconröhrchen gesetzt wurde, bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml Perizyten-Wachstumsmedium (siehe oben) aufgenommen und auf Fibronektin beschichtete 12,5 cm² Zellkulturflaschen ausgebracht. Die HRP konnten bis zur zwölften Passage kultiviert werden.

Die Choroideae mit dem retinalen Pigmentepithel wurden ebenfalls im Kollagenase/Dispase-Gemisch aufgenommen und mehrfach während der Inkubation bei 37°C gevortext. Nach 30 min wurden die Choroideae entfernt und das Gemisch bei 280 x g für 5 min zentrifugiert. Die sedimentierten retinalen Pigmentepithelzellen wurden in RPE-Medium (siehe oben) aufgenommen und in Fibronectin beschichtete 12,5 cm² Kulturflaschen gegeben.

2.2.1.2 Präparation humaner Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) (nach Jaffe et al., 1973)

Dispase-Lösung:	10% (w/v) Dispase (2,4 U/mg) in 1 x PBS lösen und sterilfiltrieren
IMDM Medium für HUVEC:	15% (v/v) FCS 5% (v/v) humanes Serum 2,7 mM Na-Bicarbonat 0,4 mM L-Glutamin 100 IU/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin 2,5 ng/ml bFGF

Zur Isolierung der HUVEC wurden maximal 48 Stunden alte humane Nabelschnüre (von der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums der Goethe Universität zur Verfügung gestellt) verwendet. Die Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Jaffe. Unter sterilen Bedingungen wurden die Nabelschnüre zunächst gereinigt und auf Risse und Einstichlöcher kontrolliert. Mithilfe von Einmalskalpellen wurden die Enden der Nabelschnüre abgeschnitten, je eine Knopfkanüle in die Umbilicalvene eingeführt und mit einer Arterienklemme fixiert. Anschließend wurde die Vene mit 1 x PBS mehrfach gespült. Nach Abklemmen des distalen Endes durch eine weitere Arterienklemme wurde die Dispase-Lösung appliziert und die Nabelschnur für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Endothelzellen mit 1 x PBS in ein Falconröhrchen, in welchem zur Inaktivierung des Enzyms FCS vorgelegt worden war, herausgespült. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 160 x g. Die Zellen wurden in HUVEC-Medium resuspendiert und in mit extrazellulärer-Matrix beschichtete 12,5 cm² Zellkulturflaschen überführt. Die HUVEC konnten bis zur achten bis zehnten Passage kultiviert werden.

2.2.1.3 Kultivierung etablierter Zelllinien

Zellkulturmedien:

DMEM Ham's F12 Medium für HFF:	10%	(v/v)	FCS
	2	mM	HEPES
	0,4	mM	L-Glutamin
	100	IU/ml	Penicillin
	10	mg/ml	Streptomycin
DMEM-Medium für 293T und HT1080: (mit Glutamin/ 4,5g/l Glukose)	10%	(v/v)	FCS
	20	mM	HEPES
	1	mM	Natriumpyruvat
	100	IU/ml	Penicillin
	100	mg/ml	Streptomycin
IMDM Anzuchtmedium für Cos-7-Zellen:	10%	(v/v)	FCS
	3,6	mM	Na-Bicarbonat
	0,4	mM	L-Glutamin
	100	IU/ml	Penicillin
	10	mg/ml	Streptomycin
Trypsin/EDTA:	1570	U/ml	Trypsin(Schweine Pankreas)
	0,05	mM	EDTA
	in 1 x PBS lösen		

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

2.2.1.4 Passagieren von konfluenten Zellen

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin/EDTA vom Gefäßboden gelöst. Die Zellen wurden zur Trypsin-Inaktivierung in FCS-haltigem Medium aufgenommen und im gewünschten Verhältnis auf neue Kulturflaschen/-schalen passagiert.

2.2.1.5 Langzeitlagerung und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Das Einfriermedium wurde in zwei Gefäßen vorgelegt. In das erste Gefäß wurden 10% FCS mit Medium pipettiert und in das zweite Gefäß dasselbe Volumen mit 10% FCS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO). Zum Einfrieren wurden die Zellen gewaschen, mit Trypsin/EDTA gelöst, in FCS-haltigem Medium aufgenommen und abzentrifugiert (280 x g / 5 min). Anschließend wurden die Zellen im Einfriermedium ohne DMSO aufgenommen.

Beide Gefäße wurden für 30 min im Kühlschrank heruntergekühlt. Im Anschluss wurde der Inhalt beider Gefäße gepoolt und in vorbeschriftete und gekühlte Einfrierröhrchen überführt. Mittels Einfrierboxen (NALGENE Labware, Roskilde, Dänemark) wurden die Zellen 1°C pro Minute im -80°C-Gefrierschrank heruntergekühlt. Zur Langzeitaufbewahrung erfolgte die Überführung der Einfrierröhrchen in den Stickstofftank (-196°C). Das Auftauen der Zellen erfolgte in Auftaumedium (2% FCS in 1 x PBS). Die Zellen wurden für 5 min bei 280 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend in Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.6 Vitalitätstest mittels Trypanblau

Trypanblau ermöglicht die Differenzierung toter und lebender Zellen und basiert auf dem Eindringen des blauen Farbstoffes Trypanblau durch defekte Zellmembranen von toten Zellen. Dazu wurden adhärente Zellen trypsiniert und in FCS-haltigem Medium resuspendiert. Nach Entnahme von 20 µl Zellsuspension erfolgte die Zugabe von 20 µl Trypanblau-Lösung (0,4%), so dass ein Mischungsverhältnis von 1:1 bestand. Anschließend wurden die Zellen mittels Bürker-Zählkammer oder des „Countess“-Zählgerätes (Invitrogen GmbH, Darmstadt) ausgezählt und die prozentuale Verteilung der toten Zellen berechnet.

2.2.2 Infektion mit HCMV

Erhaltungsmedium:	IMDM/DMEM-Medium
	5% (v/v) FCS
	0,4 mM Glutamin
	2,7 mM Na-Bicarbonat
	100 IU/ml Penicillin
	10 mg/ml Streptomycin

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60-80% kultiviert. Aus Vorversuchen, in denen die Perizyten in verschiedenen Konfluenzstadien infiziert wurden, konnten bei 60-80% Konfluenz die besten Ergebnisse erzielt werden. Aus der Stocklösung der Virus-suspension mit bekanntem Titer (*Immediate Early forming units* (IEFU/ml)/pro ml) wurde mit Erhaltungsmedium eine entsprechende Lösung hergestellt. Durch vorheriges Auszählen wurde die Zellzahl bestimmt und die entsprechend benötigte Virusmenge (*multiplicity of infection*: MOI) berechnet. Das Medium wurde aus den Kulturflaschen entfernt und durch

das virushaltige Erhaltungsmedium ersetzt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Danach wurde die Viruslösung abgesaugt, dreimal mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen anschließend in Erhaltungsmedium kultiviert. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Infektion wurden die Zellen auf *immediate early* und *late* Proteine gefärbt.

2.2.3 Titerbestimmung

Zur Überprüfung, ob in HRP reife HCMV-Partikel produziert werden, wurden diese wie unter 2.2.2 beschrieben mit HCMV infiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellkulturflaschen bei -80°C eingefroren und die Zellen durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren lysiert. Die Zelllysate wurden in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4600 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen. Die Überstände, die die Viren enthielten, wurden in zwei Ultrazentrifugationsröhrchen gefüllt. Die Ultrazentrifugation wurde im Anschluss bei 50000 x g für 2 h 30 min bei 4°C durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und das Virusediment in 5 ml serumfreiem Medium aufgenommen, resuspendiert und in eine abgedunkelte Glasflasche überführt. Zur Titerbestimmung wurden die IEFU/ml ermittelt (Braun & Schacherer, 1988). Dazu wurden Vorhautfibroblasten in eine 96-Loch Platte ausgesät und bis zur Konfluenz inkubiert. Mit der zuvor hergestellten Viruslösung wurde im 1/5 Verhältnis eine Verdünnungsreihe in Erhaltungsmedium angesetzt. Die Infektion der HFF erfolgte wie unter 2.2.2 beschrieben. Am nächsten Tag wurde eine HCMV IE-Färbung durchgeführt und die Verdünnungsstufe ausgezählt, bei der ca. 30-60 Kerne/Loch angefärbt worden waren. Die einzelnen Werte wurden gemittelt und aus diesen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Titer in IEFU/ml berechnet.

2.2.4 Immunhistochemische/-zytochemische Färbung

Aceton/Methanol-Fixierlösung:	40%	(v/v)	Aceton
	60%	(v/v)	Methanol
Blocking Solution:	5%	(v/v)	Ziegenerum
	2%	(w/v)	BSA
	in 1 x Waschpuffer		

10 x Waschpuffer:	11 mM Tris-HCl 0,5 M NaCl 0,1% (w/v) BSA 0,01% (v/v) Thimerosal 1% (v/v) Tween 20 mit HCl auf pH 7,45 einstellen
Acetat-Puffer:	12,5 mM Natriumacetat (wasserfrei) mit Eisessig auf pH 5,0 einstellen
AEC-Lösung:	0,12% (w/v) 3-Amino-ethyl-carbazol 30% (v/v) N,N-Dimethylformamid in Acetatpuffer kurz vor Gebrauch: 1% H ₂ O ₂ frisch zu filtrierten AEC- Lösung hinzufügen
Giensa-Stammlösung (Carl Roth, Karlsruhe):	Giensa mit Aqua dest. 1:5 verdünnen

Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit eiskaltem Methanol/Aceton-Gemisch für 10 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte das Blockieren unspezifischer Bindungen mit Blocking Solution für 30 Minuten bei 37°C. Die spezifischen Primärantikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung mit 1 x Waschpuffer auf die Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x Waschpuffer wurde für weitere 30 min bei 37°C mit dem Biotin-Streptavidin-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach erneutem Waschen mit einem Peroxidase/Streptavidin-Konjugat für weitere 30 min bei 37°C behandelt. Nach einem abschließenden Waschschrift erfolgte eine 10-15 minütige Inkubation mit frisch filtrierter AEC-Lösung zur Detektion des gebundenen Enzyms. Anschließend wurden die Zellen 3 bis viermal gewaschen und in 1 x Waschpuffer bis zur Dokumentation bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5 May-Grünwald-/Giensa-Färbung

Die mit Aceton/Methanol (2:3) fixierten Zellen wurden für 5 min mit unverdünnter May-Grünwald-Lösung (Carl-Roth, Karlsruhe) inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Aqua dest. gewaschen und die Zellen für 30 min mit Giensa-Lösung (1:5) gefärbt. Die Färbung wurde durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser gestoppt und die Zellen zur Dokumentation fotografiert.

2.2.6 Färbung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und Integrine am Durchflusszytometer

Mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorting*) ist eine Analyse von Zellen bezüglich ihrer physikalischen sowie molekularen Eigenschaften, wie deren Größe und Granularität möglich.

Die Expression von ICAM-1, des EGF-Rezeptors und der Integrine $\alpha 2$, $\alpha 6$, αv und $\alpha v\beta 3$ wurde am Durchflusszytometer mithilfe spezifischer fluoreszierender Antikörper untersucht. Für jede gefärbte Probe wurden eine ungefärbte Kontrolle und eine Isotypenkontrolle mitgeführt. Die ungefärbte Kontrolle wird zum Einstellen am Durchflusszytometer benötigt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen bestimmen und subtrahieren zu können. Die Isotypenkontrolle dient als Kontrolle für die unspezifische Bindung des Antikörpers und wird von der gefärbten Probe abgezogen. Dabei muss die Isotypenkontrolle mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff markiert sein wie der eingesetzte Sekundärantikörper. Für die FACS-Messung wurden die Zellen trypsiniert, in PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei $280 \times g$ für 5 Minuten, der Überstand wurde verworfen und die Zellen auf die spezifischen Proteine gefärbt. Die Zellen wurden für 30 min bei 4°C mit dem Primärantikörper gegen das jeweilige Protein inkubiert. Nach einem Waschschriff mit $1 \times \text{PBS}$ und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet für 30 min bei 4°C mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) markiert war und auch für die Isotypenkontrolle eingesetzt wurde. Nach einem weiteren Waschschriff und anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in $300 \mu\text{l } 1 \times \text{PBS}$ resuspendiert und die Proben am Durchflusszytometer FACSCantoII (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) analysiert.

2.2.7 Mikrokinematographie

Die Zellen (HRP, RPE und HFF) wurden am Vortag in 25 cm^2 Kulturflaschen ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 50 – 70% mit HCMV-Hi91 infiziert, als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen (Mock-Kontrolle). Bevor die Zellen in die Mikrokinematographie-Apparatur gestellt wurden, erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem 37°C warmem Medium. Die Zellkulturflasche wurde in die vorgewärmte

Mikroskopisch-Einrichtung eingespannt und ein geeignetes Sichtfeld bei einer 200-fachen Vergrößerung eingestellt. Anschließend wurde die Kulturflasche fest mittels Metallstreben am Mikroskopisch fixiert. Die Aufnahmen von Bildern erfolgte mithilfe der Software QuickPHOTO MICRO 2.3 (PROMICRA, Prag) alle 30 Sekunden für 3 bis 15 Tage. Die Auswertung der Bilder und die Erstellung eines Filmes erfolgten mit der Software JPG Video (SnapFiles). Die Bearbeitung wurde mit der Software Adobe Premiere Pro (Adobe Systems GmbH, München) durchgeführt.

2.2.8 Elektronenmikroskopie (EM)

Fixierlösung I:	0,1 M	Phosphatpuffer
	12,5% (v/v)	Glutaraldehyd

Fixierlösung II:	0,2 M	Phosphat-Puffer
	20% (v/v)	Glutaraldehyd

HCMV-infizierte bzw. nicht infizierte Perizyten wurden bis zu einem maximalen Konfluenzgrad von 50-80% in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) wurden Ansätze für die EM mittels Fixierlösung II gestoppt. Hierzu wurde die Hälfte des Kulturmediums abgenommen und langsam durch 37°C warme Fixierlösung II unter ständigem Mischen ersetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT wurde das Gemisch vollständig entfernt und durch 5 ml Fixierlösung I ersetzt. Die Perizyten wurden mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst, in Falconröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 280 x g bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml frischer Fixierlösung I aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C aufbewahrt. Die Präparate für die EM wurden in Prag am Institut KlinLab Strešovice angefertigt. Die Proben wurden in 1% Osmiumtetroxid nachfixiert, in Ethanol dehydriert und mit Resin (Durcupan-Epon, Fluka, Buchs) eingebettet. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und zur Dokumentation mittels des Elektronenmikroskops (Model: JEM 2000 CX, JOEL, Arishima, Japan) Aufnahmen erstellt.

2.2.9 Durchführung von Adhäsionsstudien (nach Sashwati et al., 1997)

Zur Überprüfung der Funktionalität von überexprimierten ICAM-1 und LFA-1 (Lymphozyten funktionelles Antigen-1) in retinalen Perizyten nach einer Infektion mit HCMV wurden Adhäsionsstudien durchgeführt. Hierzu wurden 10^4 Zellen/well in 96-Loch Platten ausgesät und nach 24 h wie in 2.2.2 beschrieben mit HCMV infiziert. Als positive Kontrolle für eine ICAM-1-Überexpression wurden die Perizyten mit Interferon γ (1000 IU/ml) inkubiert. Nach 6, 24 und 72 Stunden wurde der Adhäsionsassay durchgeführt. Die Perizyten und HFF wurden zweimal mit $1 \times$ PBS gewaschen und 2×10^5 Jurkat-Zellen/Cavität auf die Zellen gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 , wurden die nicht adhärenen Jurkat-Zellen durch viermaliges Waschen mit $1 \times$ PBS entfernt. Die adhärenen Zellen wurden mit einem spezifischen Antikörper für Jurkat-Zellen (CD3) angefärbt. Es wurden je drei bis fünf Gesichtfelder ausgezählt und die prozentuale Adhäsion berechnet. Zur Überprüfung der spezifischen Bindung der Jurkat-Zellen an ICAM-1 bzw. LFA-1 wurden beide Adhäsionsmoleküle durch spezifische Antikörper 30 min vor dem Adhäsionsassay blockiert.

2.2.10 Expressionsstudien mittels quantitativer RealTime-PCR

Für den Vergleich der Genexpression von nicht infizierten Mockzellen und HCMV-infizierten Zellen wurde aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde mithilfe des High Capacity RNA-to-cDNA Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt) in cDNA umgeschrieben und für die quantitative RealTime-PCR eingesetzt, welche im 7900HT Fast RealTime PCR System (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt wurde.

2.2.10.1 Präparation von Ribonukleinsäure (RNA)

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels des *PeqGold Total RNA Kits* (PeqLab Biotechnologie, Erlangen). Nach Absaugen des Mediums wurde eine der Zellzahl entsprechenden Menge *TRK*-Lysepuffer zu den Zellen gegeben. Das Zelllysat wurde zur Homogenisierung auf die *Shredder*-Säule pipettiert und eine Minute bei $12000 \times g$ bei RT zentrifugiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens 70%-igen Ethanol zum Durchfluss wurde das Gemisch auf *PerfectBind*-Säulen pipettiert und eine Minute bei $10000 \times g$ bei RT zentrifugiert, mit $500 \mu\text{l}$ Waschpuffer I einmal und zweimal mit $600 \mu\text{l}$ Waschpuffer II gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte durch eine Zentrifugation für 2 min bei $10000 \times g$

bei RT mit 50-100 μl RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch gemessen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.10.2 Reverse Transkription

Aus der isolierten RNA wurde zunächst mittels High Capacity RNA-to-cDNA Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt) selektiv mRNA in cDNA (siehe Tabelle 2.2.1) umgeschrieben.

Tabelle 2.2.1: Pipettierschema für einen RT-Ansatz.

Komponenten	Menge in μl
2 x RT Puffer	10
20 x Enzym Mix	1
Gesamt-RNA (2 μg)	max. 9
RNase/DNase freies H_2O	auf 20 μl auffüllen

Thermo Cycler: Inkubation: 60 min 37°C , Reaktionsstopp: 5 min 95°C , Kühlung: 4°C

2.2.10.3 Durchführung der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zur Expressionsanalyse bestimmter Gene (wie z.B. CXCL-8, ICAM-1) der HCMV-infizierten und nicht infizierten Mockzellen wurde die cDNA als Matrize für die qRT-PCR eingesetzt. Alle Reaktionen wurden als Triplikate in *MicroAmp Optical 96-well* Platten angesetzt und mit *MicroAmp Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems, Weiterstadt) abgedeckt. Die qRT-PCR erfolgte im *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit den in Tabelle 2.1.4 aufgeführten Oligonukleotiden bzw. mit dem kommerziell erhältlichen *TaqMan Gene Expression Assay Kits* von Applied Biosystems (Weiterstadt).

Tabelle 2.2.2: Zusammensetzung eines qRT-PCR Ansatzes.

Primer mit Sonde	Primer ohne Sonde	TaqMan-Gene Expression Assay
10 μl 2 x Gene Expression Master Mix	25 μl SYBR Green Master Mix	10 μl 2 x Gene Expression Master Mix
0,3 μl forward Primer (900 nM)	0,3 μl forward Primer (900 nM)	1 μl 20 x Primer/Probe (900 nM Primer; 200 nM FAM-Sonde)
0,3 μl reverse Primer (900 nM)	0,3 μl reverse Primer (900 nM)	
0,4 μl FAM-Sonde (200 nM)		
1 μl cDNA (20-50 ng)	1 μl cDNA (20-50 ng)	1 μl cDNA (20-50 ng)
8 μl DEPC- H_2O	23,4 μl DEPC- H_2O	8 μl DEPC- H_2O
20 μl Gesamtvolumen	50 μl Gesamtvolumen	20 μl Gesamtvolumen

Temperaturprofil: 15 min 95°C, Denaturierung: 15 Sekunden 94°C, Annealing und Elongation: 1 min 60°C, 40 Zyklen. Nach Ablauf der Zyklen erfolgte die Abkühlung auf 4°C.

2.2.10.4 Relative Quantifizierung

Die Zykluszahl wird als *threshold cycle*-Wert (Ct) angegeben, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und in die exponentielle Phase übergeht. Für die Normalisierung des Assays wurde als Referenz ein Haushaltsgen (Referenzgen) eingesetzt, welches keiner Regulation in seiner Expression unterliegt. Nach Bildung der Ct-Mittelwerte wurden die Werte für das Referenzgen von denen des Zielgenes (zu analysierendes Gen) abgezogen. Die normalisierten Werte wurden dann auf einen externen Standard bezogen, wozu der jeweilige Mockansatz (cDNA nicht infizierter Zellen) diente. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen HCMV infizierten Zellen und nicht infizierten Mockzellen, normalisiert zum Referenzgen, ergibt sich aus folgender Formel:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$,
$\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenzgen})$
$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{infiziert}) - \Delta Ct(\text{Mock})$

2.2.11 Überprüfung der Chemokin-/Zytokinexpression mittels ELISA

(R&D Systems, Abington, UK)

“Reagent Diluent I” (Blockpuffer I):	1% (w/v) BSA in 1 x PBS
“Reagent Diluent II”:	0,1% (w/v) BSA 0,05% (v/v) Tween in 1 x TBS
Blockpuffer II:	1% (w/v) BSA 0,05% (w/v) NaN ₃ in 1 x PBS

TBS:	20	mM Tris/HCl, pH 7,5
	15	mM NaCl

Die Zellen wurden mit HCMV-Hi91 und UV-inaktiviertem HCMV-Hi91 infiziert, als Kontrolle dienten uninfizierte Mockzellen. Um die Expression der Chemokine und Zytokine zu untersuchen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Überstände von den Zellen abgenommen, aliquotiert und bis zur ELISA-Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Vor der ELISA-Analyse wurden 96-Loch-ELISA-Platten mit dem jeweiligen Chemokin/Zytokin *capture*-Antikörper des DuoSet ELISA Development Kits (R&D Systems, Minneapolis, USA) beschichtet und über Nacht unter Schütteln bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen und bei RT mit Blockpuffer behandelt. Die Standardverdünnungen der jeweiligen Stocklösungen für die Chemokine/Zytokine aus dem Kit erfolgten in 1:2 Verdünnungsschritten mit „Reagent Diluent“. Die weitere Durchführung des Kits wurde nach Angaben des Herstellers (R&D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt. Die photometrische Messung der ELISA-Platten erfolgte am Infinity 200 (Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 450 nm und 560 nm (Referenz).

Von den mit dem Expressionsplasmiden pCGN und pCGN-IE1/2 transfizierten Zellen wurden Überstände gesammelt und diese, wie oben beschrieben, im ELISA die Chemokin- und Zytokinexpression untersucht.

2.2.11.1 Transfektion

2.2.11.1.1 Calciumphosphattransfektion (nach Chen, 1987 & Okayana, 1988)

2 x HEBS-Puffer:	50	mM HEPES
	1,5	mM Na ₂ HPO ₄
	10	mM KCl
	280	mM NaCl
	12	mM Glukose
	Mit NaOH auf pH 7,05 einstellen, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.	

Für die Transfektion betrug der Konfluenzgrad der am Vortag ausgesäten Zellen 60 bis 80%. Eine Stunde vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Das Medium enthielt zur Erhöhung der Transfektionseffizienz zusätzlich Chloroquin in einer Molarität von 25 µM. Für einen 24-Loch Transfektionsansatz wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 8 µl 2 M Calciumchlorid-Lösung und 2,5 µg Plasmid-DNA auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit

ddH₂O gebracht. In ein weiteres 1,5 ml Gefäß wurden 50 µl des 2 x HEBS-Puffers vorgelegt. Anschließend wurde das DNA-Gemisch durch starkes Mischen zu den 50 µl HEBS-Puffer pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für größere Ansätze in 10 cm² Kulturschalen wurden die Mengenangaben entsprechend erhöht. Das DNA-Präzipitat wurde tropfenweise zu den Zellen pipettiert und bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 48 h und 72 h wurde die Transfektionseffizienz mikroskopisch und mittels Durchflusszytometrie überprüft.

2.2.11.1.2 Lipofectamine™2000 Transfektion (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Die Zellen wurden am Vortag in antibiotikafreiem Medium auf 24-Loch Platten ausgesät. Die Konfluenz der Zellen betrug am Tag der Transfektion 70-90%. In ein Eppendorfgefäß wurden 50 µl OptiMEM mit 2 µl Lipofectamine gegeben und in ein weiteres 50 µl OptiMEM mit den zu transfizierenden Plasmiden (siehe Tabelle 2.2.3). Anschließend wurde die Plasmid-DNA zu dem Lipofectamin-Gemisch pipettiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers, wie unter 2.2.11.1.1 beschrieben.

Tabelle 2.2.3: Pipettierschema für einen Transfektionsansatz mit Lipofectamin™2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Gefäß A	Gefäß B
1500 ng Reporterplasmid und/oder	2 µl Lipofectamin™2000
187,5 ng Expressionsplasmid	50 µl Opti-MEM I
50 ng Kontrollplasmid	
50 µl Opti-MEM I	

2.2.11.2 Transduktion mit lentiviralen Überständen

2.2.11.2.1 Herstellung lentiviraler Überstände

Am Vortag wurden 4 x 10⁶ 293T-Zellen pro 10 cm² Kulturschale ausgesät. Die Transfektion erfolgte mittels der Calciumphosphat-Methode (siehe 2.2.11.1.1). Dazu wurden pro Ansatz 10-20 µg des LeGO-piG2-BSD-IE1 bzw. -IE2 Konstrukte zusammen mit 10 µg des pMDLg/pRRE Plasmids, 5 µg des pRSV-Rev-Plasmids sowie 2 µg des Hüllprotein-Plasmids pHCMV-VSV-G in einem Falconröhrchen zu einem 500 µl Ansatz pipettiert. In einem zweiten Röhrchen wurden 500 µl 2 x HEBS-Puffer vorgelegt. Beide Ansätze wurden gepoolt

und 20 Minuten bei RT inkubiert. Vor Zugabe des Transfektionsansatzes wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, zu dem Medium wurde Chloroquin in einer Konzentration von 25 μM zugegeben. Nach einer 5 bis 12 Stunden Inkubation erfolgte erneut ein Mediumwechsel und nach weiteren 48 Stunden wurden die viralen Überstände abgenommen. Zur Entfernung von Zellresten erfolgte eine Filtration der Überstände durch einen 0,2 μm Sterilfilter. Danach wurden die Überstände titriert, direkt für die Transduktion verwendet oder aliquotiert bei -80°C weggefroren.

2.2.11.2.2 Titration der lentiviralen Überstände

2.2.11.2.2.1 Kristallviolett-Färbung zur Titerbestimmung

Kristallviolett-Lösung:

1%	(w/v)	Kristallviolett
10%	(v/v)	Ethanol

Die Bestimmung des Titers erfolgte mithilfe von HT1080 Zellen, welche am Vortag pro Vertiefung 2×10^5 in 6-Loch Platten ausgesät wurden. Die Transduktion der humanen Fibrosarkomzellen erfolgte mit 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polybren, wie in 2.2.11.2.3 beschrieben. Es wurden fünf Verdünnungen der Virusstocklösung hergestellt, welche auf die Zellen gegeben wurden. Ein 6-Loch-Ansatz diente als Kontrolle (Mockzellen, nicht transduziert). Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 48 h erfolgte die Blasticidin-Selektion für 8 bis 14 Tage. Anschließend wurden die Zellen mit der Kristallviolett-Lösung gefärbt. Nach 3-maligem Waschen mit $1 \times \text{PBS}$ wurden die Zellkolonien auf den 6-Well-Platten ausgezählt und die Titer der lentiviralen Überstände bestimmt. Zum Beispiel werden bei einer Verdünnung der Virusstocklösung von 10^{-5} 20 Kolonien gezählt, entspricht dies einem Titer von 2×10^6 TU/ml (*transducing units*), resultierend aus diesen Angaben lässt sich die MOI berechnen.

2.2.11.2.2.2 HIV-p24 Antigen ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, USA)

Die Methode zur Titerbestimmung lentiviraler Überstände stammt von Didier Trono (Trono and Salmon, 2006; Barde et al., 2010). Dabei werden mit p24-Antikörper (p24: lentivirales Kapsidprotein) beschichtete ELISA-Platten verwendet, an welche sich die im Überstand befindlichen p24-Antigene binden. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die Messung erfolgte photometrisch bei 450 nm. Anhand der mitgeführten

Standards wurde eine Eichgerade erstellt. Mithilfe der Eichgerade wurde der p24 Gehalt der jeweiligen Überstände in pg/ml ermittelt.

Für die Berechnung des Virustiters (TU/ml) wurden folgende Formeln verwendet:

$$1\text{pg} = 10^4 \text{ PP (physikalischer Lentivirus-Partikel)} = \text{TU}$$
$$1\text{PP} = 2000 \text{ Moleküle p24}$$

2.2.11.2.3 Transduktion

Die zu transduzierenden Zellen wurden am Vortag auf 24-Loch Platten ausgebracht, sodass ihre Konfluenz am Folgetag 30% bis 50% betrug. Je nach Titer der Virusstocklösung wurde eine entsprechende Menge des lentiviralen Überstandes auf die Zellen pipettiert, um eine gewünschte MOI zu erhalten. Für eine optimale Transfektionseffizienz wurden 8 µg/ml Polybren zugeben mit einer einstündigen Spinokulation bei 590 x g und RT. Nach sechs bis zwölf Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Am zweiten Tag nach der Transduktion begann die Selektion durch Zugabe von 5-10 µg/ml Blasticidin. Aufgrund des GFP-Gens konnte die Transfektionseffizienz zusätzlich am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.2.11.3 Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz der primären Zellen und Zelllinien mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien und Transfektionsbedingungen wurde ein GFP-Kontrollplasmid (*green fluorescent protein*, Lonza) transfiziert (siehe 2.2.11.1). Durch Anregung mit blauem (488 nm) oder ultraviolettem Licht (395 nm) wird von GFP grünes Licht emittiert (509 nm). Die Zellen wurden vom Flaschenboden mit Trypsin/EDTA gelöst, in einem PBS-FCS Gemisch (10:1) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Detektion erfolgte mittels des FACSCantoII (Becton Dickinson, GmbH, Heidelberg).

2.2.12 Western Blot-Analyse

Lysispuffer I (Triton X-100 Lysispuffer):	20	mM Tris/HCl, pH 7,5
	150	mM NaCl
	10	mM Tetra-Natriumdiphosphatdecahydrat
	20	mM NaF
	1%	(v/v) Triton X-100
		1 x Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) immer frisch zugeben.
10 x SDS-PAGE Laufpuffer:	250	mM Tris-Base
	1,9	M Glycin
	1%	(w/v) SDS
		Für 1 x Laufpuffer pH-Wert auf 8,3 einstellen.
10 x Transferpuffer:	250	mM Tris-Base
	1,9	M Glycin
		Für 1 x Transferpuffer 20% (v/v) Methanol dazugeben und pH-Wert auf 8,3 einstellen.
10 x Waschpuffer:	500	mM Tris-Base
	1,5	M NaCl
		pH-Wert auf 7,5 einstellen
1 x Waschpuffer:	10%	(v/v) 10 x Waschpuffer
	0,3%	(v/v) Tween-20
1 x Blockierungspuffer:	50	mM Tris/HCl pH 7,5
	200	mM NaCl
	0,05%	(v/v) Tween-20
	3%	(w/v) BSA
5 x Laemmli-Puffer:	14,4	mM Bromphenolblau
	479,6	mM Glycerin
	19,8	mM SDS
	20%	(v/v) β -Mercapto-Ethanol (frisch zugeben) in 1 M Tris-HCl pH 6,8

Die Western Blot-Analyse dient dem Nachweis von Proteinen. Dazu werden die Proteine mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt, danach auf Nitrocellulosemembranen transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern immunohistochemisch nachgewiesen.

2.2.12.1 Proteinextraktion und Konzentrationsbestimmung

Von den zu untersuchenden Zellen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten Zelllysate entnommen. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen einmal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und 300-1000 μ l Lysispuffer zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 20000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden mittels DC (Detergent Compatible) Protein-Assay (Bio-Rad GmbH, München) nach Angaben des Herstellers quantifiziert. Die Proben wurden mit Lysispuffer auf den gleichen Proteingehalt (mindestens 0,5 mg/ml) eingestellt. Anschließend wurden die Proben 1:1 mit Laemmlipuffer verdünnt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.12.2 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurden 8%-ige Polyacrylamidgele verwendet (Tabelle 2.2.4).

Tabelle 2.2.4: Rezept zur Herstellung zweier Polyacrylamidgele.

	Sammelgel (5 %) [μ l]	Trenngel (8 %) [μ l]
Aqua dest	2480	4300
Acrylamid 30 % (w/v)	550	3200
Tris/HCl pH 6,8	440	-
Tris/HCl pH 8,8	-	4500
SDS 10 % (w/v)	35	120
APS 10% (w/v)	24	90
TEMED	4,5	15

Die Gelelektrophorese erfolgte für 30 min bei einer Stromstärke von 30 mA und anschließend 1-2 h bei 60 mA.

2.2.12.3 Immunhistochemischer Proteinnachweis

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (NC) übertragen. Um einen guten Transfer der Proteine zu gewährleisten, wurden die Gele luftblasenfrei im Sandwichverfahren zwischen Fibropads und Filterpapier auf die NC-Membran gelegt und in die Blotvorrichtung der Apparatur von Bio-Rad (München) gespannt. An die mit 1 x Transferpuffer gefüllte Apparatur wurde für 1,5 h eine Stromstärke von 250 mA angelegt. Anschließend wurden die NC-Membranen zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen in

Blockpuffer gelegt und für 40 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach 5-maligem Waschen und weiterer 40-minütiger Inkubation in Blockpuffer wurden die NC-Membranen für 60 min mit dem Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Es wurde erneut 5-mal gewaschen und zur Visualisierung der Proteine das „ECL Western Blotting Analyses System“ (Pierce) nach Angaben des Herstellers verwendet. ECL steht für *enhanced chemoluminescence*, mit diesem Verfahren wird Luminol durch das Enzym Meerrettichperoxidase oxidiert und emittiert Photonen (Lichtemission), diese Lichtreaktion wurde mithilfe eines Röntgenfilms detektiert. Der belichtete Film wurde nach Standardmethoden entwickelt und zur Dokumentation digitalisiert.

2.2.13 Nachweis der Untereinheiten p50 und p65 des Transkriptionsfaktors NF-κB

Zur Bestimmung der Transkriptionsfaktoruntereinheiten wurden Kern- und Zytoplasmaextrakte verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Anleitung des *Nuclear Extract Kits* (Active Motif, California, USA). Der Nachweis von NF-κB p50 und p65 wurde nach Anleitung des *TransAM NFκB p65 und p50 Chemi Kits* (Active Motif, California, USA) durchgeführt.

2.2.14 Bakterienkultur

LB-Medium:	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren.
LB-Medium mit Antibiotikum:	Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml)
LB-Agarplatten:	LB-Medium + 1,5% (w/v) Agar-Agar (Antibiotika siehe LB-Medium)
SOC-Medium:	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose

2.2.15 Herstellung chemokompetenter E. coli-Zellen

MOPS I (RFI):

0,1	M	MOPS-Puffer
10	mM	RbCl
50	mM	MnCl ₂

Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.

MOPS II (RFII):

0,1	M	MOPS-Puffer
10	mM	RbCl
70	mM	CaCl ₂

Mit NaOH auf pH 6,5 einstellen.

100 ml LB-Medium wurden mit 200 µl einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 200 UpM bis zum Erreichen einer OD_{600 nm} von 0,2 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4600 x g und 4°C für 10 min sedimentiert, der Überstand verworfen und in 20 ml eiskalter MOPS I Lösung resuspendiert. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, nach Verwerfen des Überstandes, wurde das Bakterienpellet in 20 ml MOPS II Lösung resuspendiert und wiederum für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 3000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, die Bakterien in 3-5 ml MOPS II Lösung resuspendiert und aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoffs schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.16 Klonierung der Promotorkonstrukte

2.2.16.1 Herstellung von Promotorkonstrukten mittels PCR

Anhand der Promotorsequenzen aus der *Ensembl Genom* Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>) und Literaturrecherchen wurden spezifische Primer für die Amplifizierung unterschiedlicher Promotorregionen der Chemokin- und Zytokingene ausgewählt. Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die spezifischen DNA-Fragmente, welche in den pGL3-Basic Vektor bzw. zunächst in den pCR-Blunt II-Topo inkloniert werden sollten, amplifiziert. Die dazu verwendete genomische DNA wurde mittels des *QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kits* (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Es wurden zwei unterschiedliche *Proof reading* DNA-Polymerasen verwendet. Folgende Komponenten wurden in einen 50 µl Ansatz pipettiert:

Tabelle 2.2.5: PCR mit Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Komponenten	Mengen [μ l]
10 x Pfx Puffer	5
MgSO ₄ (50 mM)	1
dNTP-Mix (10 mM)	1,5
genomische DNA (50-200 ng)	1
<i>forward</i> Primer	1
<i>reverse</i> Primer	1
Pfx-Polymerase (20000 U/ml)	0,5
Betain (5M)	5
Aqua dest.	34

Pfx-DNA-Polymerase-Temperaturprofil:
Denaturierung: 94°C, Hybridisierung: 55°C,
Elongation: 68°C, Zyklen: 42

Tabelle 2.2.6: PCR mit Pfu-DNA-Polymerase (Agilent Technologies, Waldbronn).

Komponenten	Mengen [μ l]
10 x Pfu Puffer	5
dNTP-Mix (10 mM)	1
genomische DNA (50-200 ng)	1
<i>forward</i> Primer	1
<i>reverse</i> Primer	1
Pfu-Polymerase (2500 U/ml)	0,5
Betain (5M)	5
Aqua dest.	35,5

Pfu-DNA-Polymerase-Temperaturprofil:
Denaturierung: 95°C, Hybridisierung: 55°C,
Elongation: 68°C, Zyklen: 42

2.2.16.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Entfernung nicht eingebauter Nukleotide, Enzyme und Primer wurden die PCR Produkte aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte mittels des QIAquick Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Zur Aufkonzentrierung der PCR-Produkte wurde falls erforderlich, eine Ethanol- oder Isopropanol-Fällung vorgenommen. Bei der Fällung mit Ethanol wurde 1/10tel des Probenvolumens mit 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem 2,5 fachen Volumen an absolutem Ethanol zur Probe gegeben. Bei der Isopropanolfällung wurde das 0,7 fache Volumen Isopropanol zur Probe gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei -20°C wurde für 30 Minuten bei 20000 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA mit 70%-igen Ethanol für 5 min bei 20000 x g bei RT gewaschen. Nach Trocknung der Proben wurden diese in einem geringen Volumen RNase/DNAse freiem Wasser resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.16.3 Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE Puffer:	2	M	Tris/HCl, pH 7,8
	50	mM	Na ₂ EDTA
	5,7%	(v/v)	Essigsäure
6 x DNA-Ladepuffer	0,25%	(v/v)	Bromphenolblau
	0,25%	(v/v)	Xylencyanol
	30%	(v/v)	Glycerol
	50	mM	EDTA, pH 8,0

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten sowie die Bestimmung ihrer Größe. Dazu wurde eine entsprechende Menge Agarose eingewogen und durch Aufkochen in 1 x TAE Puffer gelöst. Nach Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid wurde die Agaroselösung in einen Flachbrettschlitten gegossen, der entsprechende Kamm eingesetzt und das Agarosegel auspolymerisiert. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde ein DNA-Größenmarker mitgeführt. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel mittels einer UV-Kamera fotografiert.

2.2.16.4 Restriktionsverdau

Für die bidirektionale Klonierung wurde sowohl der pGL3-Basic Vektor, als auch die gereinigten PCR-Produkte mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen nacheinander geschnitten, um zueinander kompatible „sticky ends“ zu erzeugen (Tabelle 2.2.7). Die Inkubation erfolgte jeweils über Nacht bei 37°C und die geschnittenen PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt. Der pGL3-Basic Vektor wurde nach der zweiten Restriktion zur Vermeidung von Religationsereignissen mit alkalischer Phosphatase behandelt.

Tabelle 2.2.7: Pipettierschema für einen Ansatz analytischen und präparativen Restriktionsverdau.

Komponenten	Eingesetzte Mengen für den präparativen-Verdau [µl]	Eingesetzte Mengen für den analytischen-Verdau [µl]
Plasmid-DNA/PCR-Produkt	x (5-10 µg)	10 (1-5 µg)
NE-Puffer*	15	2
BSA (100 mg/ml)	1,5	0,2
Enzym (20000 U/ml)*	3	1
Aqua dest.	auf 150 µl auffüllen	6,8

*Restriktionsenzyme (NEB-BioLabs) mit zugehörigen NE-Puffer: KpnI-HF-NEBuffer 4, MluI-NEBuffer 3, XhoI-NEBuffer 4 und NheI-HF-NEBuffer 4

2.2.16.5 Aufreinigung mittels präparativen Agarosegelen

Die Auftrennung der geschnittenen DNA erfolgte in einem präparativen Agarosegel. Die für eine spätere Klonierung eingesetzten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten.

2.2.16.6 Gel-Extraktion

Die DNA wurde mithilfe des QIAquick Gel Extraktions Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Nach Wiegen des Gelstückes erfolgte die Zugabe des dreifachen Volumens QG-Puffer. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 50°C und dem vollständigen Auflösen des Gels, wurde die Probe auf eine QIAquick Spin Säule gegeben. Bei DNA-Fragmenten unter 500 bp wurde zusätzlich dasselbe Volumen des Gelstückes Isopropanol hinzu pipettiert, um die Ausbeute zu erhöhen. Nach der Zentrifugation für 1 min bei 20000 x g und RT erfolgte die Bindung der DNA an die Säulenmatrix. Das Waschen der Säule wurde mit 500 µl QG-Puffer und anschließend mit 750 µl PE-Puffer vorgenommen. Zur Trocknung der Säule wurde nochmals kurz bei 20000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 50-100 µl RNase/DNase freiem Wasser. Die Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und optisch quantifiziert oder photometrisch am NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC, Wilmington, USA) gemessen.

2.2.16.7 Ligation

2.2.16.7.1 Ligation in geschnittenen pGL3-Basic Vektor

Nach Bestimmung der Konzentrationen des geschnittenen Vektors und PCR-Produktes konnten diese ligiert werden. Für die Ligation wurde ca. 50 ng geschnittener pGL3-Basic Vektor verwendet. Es wurden verschiedene Verhältnisse an PCR-Produkt:Vektor (2:1 – 8:1) für die Ligationen eingesetzt. Dazu wurden 2 µl 10 x Ligasepuffer (NEB-Biolabs, Frankfurt), 1 µl T4-DNA-Ligase (1000 U/ml, NEB-Biolabs) sowie ein entsprechendes Volumen Aqua dest. zu einem 20 µl Ansatz ergänzt, welcher über Nacht bei 16°C inkubiert wurde.

Aufgrund der oft nur ineffizienten Restriktion von PCR-Produkten und der damit auftretenden Schwierigkeit bei der Klonierung wurden einige PCR-Produkte zunächst in den pCR-Blunt II-Topo Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers subkloniert. Aus diesem Vektor wurden die PCR-Produkte mit den entsprechenden

Restriktionsenzymen herausgeschnitten und nach Aufreinigung für die Ligation in den pGL3-Basic Vektor eingesetzt.

2.2.16.7.2 Transformation

Zu den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurde der Ligationsansatz pipettiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden und anschließend eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Es wurden 500 µl LB-Medium (bzw. SOC Medium) zu den Bakterien pipettiert und der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C und 200 UpM inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Analyse einer erfolgreichen Klonierung wurden pro Transformationsansatz 12 – 48 Bakterienkolonien in je 5 ml LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotikum) abgeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus 1,5 -2 ml der jeweiligen ÜNK wurde mittels Mini-Präparations-Analyse (siehe Kap. 2.2.16.8.1) die Plasmid-DNA isoliert und einer analytischen Restriktionsanalyse unterzogen.

2.2.16.8 Präparation von Plasmid-DNA

2.2.16.8.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (nach Birnboim & Doly, 1979)

Lösung I:	25	mM	Tris-HCL, pH 8,0
	10	mM	EDTA, pH 8.0
	50	mM	D-Glukose
	steril filtrieren und bei 4°C aufbewahren		
Lösung II:	0,2	N	NaOH
	1%	(w/v)	SDS
Lösung III:	5	M	Kaliumacetat
	2	M	Eisessig
	mit Eisessig pH 4,8 einstellen		
PCI:	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)(v/v/v)		

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA dient zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung mit anschließender Restriktionsanalyse. Hierzu wurden Bakterienkolonien von Agarplatten gepickt und in je 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum bei 37°C

über Nacht inkubiert. 1,5 – 2 ml der Übernachtskulturen (ÜNK) wurden bei 4600 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl Lösung I resuspendiert. Zum Lysieren der Bakterien wurden 250 µl Lösung II hinzugefügt, gemischt und nach einer 5-minütigen Inkubation wurde zur Neutralisation 250 µl Lösung III zugegeben. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 20000 x g bei RT und der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einer PCI-Extraktion (25:24:1) erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA durch Zugabe des 0,7 fachen Volumens Isopropanols und einer anschließenden Zentrifugation bei 20000 x g bei RT für 15 Minuten. Die gefällte Plasmid-DNA wurde 1 x mit 70%-igen Ethanol gewaschen und in 40 µl TE-Puffer mit 0,5 mg/ml RNase A zurückgelöst. Für die Sequenzierung wurden die Mini-DNA-Präparationen mittels *QIAGEN Plasmid Mini Kit* (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.16.8.2 Maxi-Präparation

Zunächst wurden 5 ml einer Bakterienkultur in Selektionsmedium angeimpft und im Schüttler bei 37°C, 250 UpM über Nacht inkubiert. 0,1 - 0,5 ml einer ÜNK diente zum Animpfen einer 200 ml ÜNK für eine Maxi-Präparation. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mittels des *QIAGEN Endofree Plasmid Maxi Kits* (QIAGEN GmbH, Hilden). Die Bakterienkulturen wurden 15 min bei 4600 x g und 4°C zentrifugiert, das Bakterienpellet wurde anschließend in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2-Puffer und Invertieren erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden zur Neutralisation 10 ml P3-Puffer hinzugefügt, 4 bis 6-mal gemischt, das Lysat in eine QIAfilter Säule überführt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mittels Kolben durch die Säule filtriert, mit 2,5 ml ER-Puffer versetzt, 10-mal gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Filtrat wurde auf eine mit QBT-Puffer equilibrierten *QIAGEN-tip 500* Säule überführt. Nach Durchfluss folgten zwei Waschschrte durch Zugabe von je 30 ml QC-Puffer (Waschpuffer). Die Elution der Plasmid-DNA wurde mit 15 ml Elutionspuffer vorgenommen und durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol präzipitiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10000 x g wurde das DNA-Pellet 1 x mit 70%-igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in RNase/DNase-freiem Wasser zurückgelöst. Positive Klone wurden durch Sequenzierung (LGC, Berlin) bestätigt. Nach der photometrischen Messung wurde die DNA auf die gewünschte Arbeitskonzentration von 1 µg/µl eingestellt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.16.9 Quantitative Bestimmung der Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der isolierten Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mithilfe des NanoDrop-Photometers (Thermo SCIENTIFIC, Wilmington, USA) oder Eppendorf-Photometers (Eppendorf AG, Hamburg). Um eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäure zu treffen, wurden die Quotienten aus der OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt. Dabei liegt das Optimum des Quotienten für RNA bei 2,0 und für DNA bei 1,8.

2.2.16.10 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Firma LGC Genomics, Berlin (www.lgcgenomics.com).

2.2.17 Luciferase-Reporterassay (Promega, Madison, USA)

Um die Aktivität von Promotoren in eukaryontischen Zellen zu bestimmen, werden Reportergenkonstrukte eingesetzt. Dabei werden Regionen der zu untersuchenden Promotoren in einen Vektor (z.B. pGL3-Basic Vektor) vor ein Luciferase-Reporter gen kloniert, welches durch das Promotorkonstrukt aktiviert wird. Es wird das *firefly*-Luciferasegen (aus *Photinus pyralis*, dem Glühwürmchen, auch *firefly*-Luciferase genannt) als Reporter gen verwendet, dessen Produkt die Reaktion von Luciferin zu Oxiluciferin unter einer Lichtreaktion katalysiert. Diese Lichtreaktion ist eine quantifizierbare Reaktion und macht damit die Promotoraktivität messbar.

Die Reporter genkonstrukte wurden transient in Zellen transfiziert und nach Lyse der Zellen die Aktivität der Luciferase gemessen. Um Promotoraktivitäten verschiedener Konstrukte miteinander vergleichen zu können, wurde zur Standardisierung ein Vektor in konstanter Menge kotransfiziert, der eine zweite Luciferase (aus *Renilla reniformis*: *renilla*-Luciferase) exprimiert. Um die Hintergrundaktivität des Reporter gens zu ermitteln, wurde der promotorlose pGL3-Basic Vektor transfiziert. Als positive Kontrolle zur Überprüfung der Funktionalität des Assays wurde der pGL3-Control Vektor (Promega, Madison, USA) verwendet, welcher einen SV40-Promotor enthält. Beispiele der Reporter genkonstrukte sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

Die Transfektion der DNA erfolgte mittels Lipofectamin™2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) siehe 2.2.11.1.2. Am Vortag wurden 5×10^4 Zellen pro 24-Loch in Kulturmedium ohne Antibiotikum ausgesät. Vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel und die

Lipofektamintransfektion wurde für die jeweiligen Plasmide durchgeführt (siehe Tabelle 2.2.3).

2.2.18 Durchführung des Luciferaseassays

Am Tag nach der Transfektion erfolgte der Luciferaseassay mittels des Dual-Glo Luciferase Assay Systems (Promega, Madison, USA). Die Reagenzien wurden nach Anleitung des Herstellers vorbereitet. Nach Mediumwechsel wurden pro Loch je 100 µl frisches DMEM Medium ohne Phenolrot und 100 µl „Dual-Glo Luciferase Reagents“ zugegeben. Die 24-Loch Platten wurden 5-10 Minuten bis zur Lyse der Zellen geschüttelt. Die erhaltenen Überstände wurden in weiße 96-Loch Platten überführt. Am Infinite 200 (Tecan, Crailsheim) wurde die *firefly* Luciferase Aktivität des pGL3-Basic Vektors mit dem jeweiligen Promotorkonstrukten gemessen. Anschließend wurden 100 µl Stop&Glo Reagent, welches das Substrat für die *renilla* Luciferase enthält und die Aktivität der *firefly* Luciferase inhibiert, zugegeben und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Aktivität der *renilla* Luciferase wurde ebenfalls am Tecan Infinite 200 gemessen. Die Daten wurden in Excel gespeichert und die Mittelwerte der RLUs (Relative Lichteinheiten) aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

Die Auswertung des Assays wurde folgendermaßen durchgeführt:

$$RLU_{\text{gesamt}} = \frac{\textit{firefly} \textit{ RLU} \times 1000}{\textit{renilla} \textit{ RLU}}$$

Um den Einfluss der viralen IE1- und IE2-Proteine auf die jeweiligen Promotorkonstrukte zu ermitteln, wurde folgende Berechnung durchgeführt:

$$X = \text{x-fache Erhöhung im Vergleich zu pCGN [in \%]}$$
$$X = \frac{RLU_{\text{gesamt}} \text{ Expressionsplasmid (pCGN)}}{RLU_{\text{gesamt}} \text{ Expressionsplasmid mit IE1/2 (pCGN-IE1/2)}} \times 100$$

2.2.19 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programms SigmaStat (Systat Software GmbH, Erkrath). Es wurden die Standardabweichungen berechnet und mittels t-Test die Signifikanz der Daten bestimmt. Soweit Signifikanzen in den Abbildungen angegeben wurden, erfolgte zuvor eine One-Way ANOVA Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Test. Abweichungen in den statistischen Auswertungen mit $P < 0,05$ wurden als signifikant gewertet und in den entsprechenden Darstellungen mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Humane retinale Perizyten (HRP) als mögliches Zellmodell einer Zytomegalievirusinfektion

Die HCMV-Retinitis ist eine schwerwiegende Erkrankung insbesondere bei immunsupprimierten Patienten. Das Virus infiziert auf hämatogenen, als auch auf neurogenen Weg die Retina. Es durchbricht als freier Viruspartikel oder über infizierte Monozyten die Blut-Retina Schranke (BRS) und dringt in das retinale Gewebe ein (Fabricius et al., 1991). Infolgedessen kommt es durch inflammatorische Prozesse zur schweren Vitritis (Glaskörperentzündung), retinalen Mikrovaskulopathien und einer ausgeprägten Periphlebitis (Gefäßentzündung der Netzhautvenen). Diese führen zu einem starken Sehverlust mit Blutungen und Nekrosen in der Retina, welche bis zur Erblindung führen können. Die direkte Zerstörung der retinalen Zellen und der Gewebe ist auf die HCMV-Replikation zurückzuführen (Heinemann, 1992; Rao et al., 1998). Die Medikamente, welche direkt auf das Zytomegalievirus wirken, haben viele Nebenwirkungen. So kommt es z.B. bei der lokalen Implantation zu starken Blutungen in der Retina. Des Weiteren wird die HCMV-Infektion nur im inneren Auge behandelt, während das Virus die Zellen des äußeren Auges infizieren kann, dort repliziert und erneut die Retina befällt. In diesem Kontext ist die Etablierung eines neuen Zellmodells zur Untersuchung der HCMV-Retinitis und die Entwicklung neuer Therapieansätze von großer Bedeutung. An den Gefäßen der Retina befindet sich die größte Ansammlung (ca. 40%) von Perizyten (HRP) im Bezug auf den gesamten Körper. Dieser Zelltyp könnte als Modellsystem zur Untersuchung der HCMV-Retinitis sehr bedeutsam sein und Aufschluss zur Behandlung einer HCMV-Infektion geben.

3.1.1 Isolation humaner retinaler Perizyten

Bisher konnten humane retinale Perizyten nicht kommerziell erworben werden und für deren Isolierung und Kultivierung standen keine Protokolle zur Verfügung. So sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine Isolierungsmethode für retinale Perizyten entwickelt und etabliert werden. Ein Hauptproblem stellte die begrenzte Anzahl an Spenderaugen dar, um verschiedene Präparationstechniken auszutesten. Daher wurden zusätzlich bovine Augen verwendet. Des Weiteren spielt das Alter der Spenderaugen bei der

Isolation und Präparation dieses Zelltyps eine entscheidende Rolle. Es handelt sich bei HRP um Primärzellen, welche nur über eine geringe Passagenzahl kultivierbar sind. Mit zunehmendem Alter der Spender wurde es immer schwieriger, vitale Zellen zu isolieren und in Kultur zu nehmen. Ein weiteres Problem stellte die Beschädigung der Retina durch die vorherige Präparation der Hornhaut für die Transplantation dar. Waren die gefäßreichen Regionen der Retina beschädigt, gelang es nicht, die isolierten Perizyten in Kultur zu nehmen und zu passagieren. In Abbildung 3.1 wird ein Flussdiagramm für die Isolierung der humanen retinalen Perizyten und der RPE schematisch dargestellt. Neben der Isolation von primären HRP konnten aus den Choroidea RPE präpariert werden, die als Kontrollzellen für ein schon bestehendes Modellsystem einer retinalen HCMV-Infektion dienen.

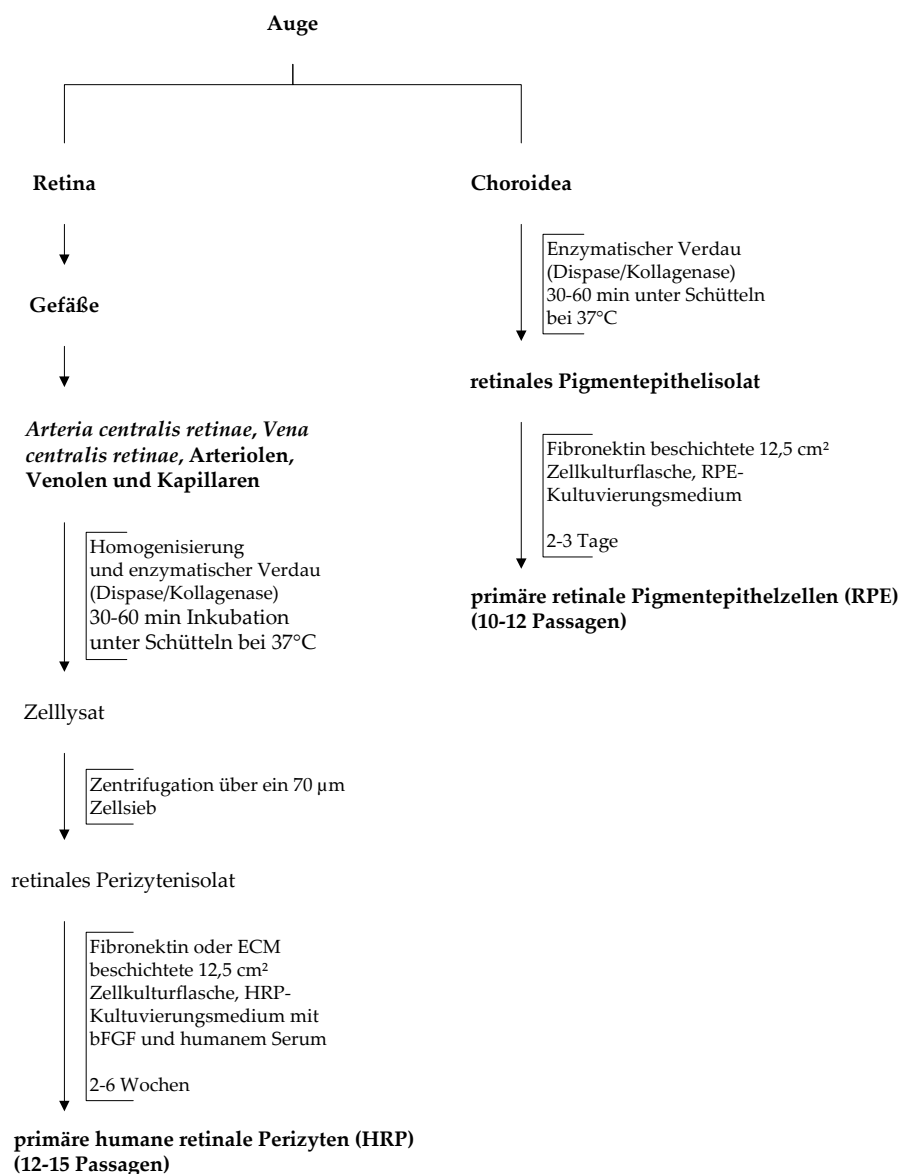


Abbildung 3.1: Flussdiagramm. Isolation der retinalen Perizyten (HRP) und Pigmentepithelzellen (RPE) aus humanen Augen.

Für die Isolation der humanen retinalen Perizyten (HRP) wurden die gefäßreichen Regionen der Retina frei präpariert, ohne die Gefäße zu verletzen (Abbildung 3.1). Wichtig war möglichst viel neuronales Gewebe zu entfernen, um den prozentualen Anteil der HRP zu erhöhen. Es wurden verschiedene Präparationstechniken ausgetestet. Anfänglich wurden die Retinastücke mit einer Schere zerkleinert und mit einem Trypsin/EDTA-Gemisch (0,25% / 0,02%) für 10-15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die kleinen Gewebestücke wurden auf Fibronectin beschichtete Kulturgefäße ausgebracht und mit wenig RPE-Medium inkubiert. Die nach 2 bis 6 Wochen an den Gefäßen auswachsenden Zellen wurden mit einer Pipette abgespült und in neue mit Fibronectin und ECM (extrazelluläre Matrix, Becton Dickenson, Heidelberg) beschichtete Kulturgefäße überführt. Die isolierten Zellen wurden in RPE-Wachstumsmedium mit 20% FCS inkubiert. Die Zellen stellten jedoch unter diesen Bedingungen ihr Wachstum ein und konnten nicht passagiert werden (Abbildung 3.2 A). Ein Problem war möglicherweise die zu aggressive enzymatische Wirkung des Trypsin/EDTA-Gemisches auf die retinalen Perizyten. Daher wurden weitere proteolytische Enzyme zum Aufschluss der Retina ausgetestet. Ferner wurde das Kultivierungsmedium weiter optimiert und weitere Matrixproteine zur Beschichtung der Zellkulturflaschen ausgetestet. Für die Isolierung der Perizyten wurden zum Aufschluss der Netzhäute weitere Verdauungsenzyme, wie Dispase (2,4 U/ml) und die Kollagenasen Typ A I und B II (1 U/mg), ausgetestet. Dazu wurden die Retinastücke zusätzlich mit einem Dounce-Homogenisator zerkleinert, sodass die Zellen intakt blieben und anschließend in der jeweiligen Enzymlösung für 30-60 Minuten unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Das Zell-Enzym-Gemisch wurde bei 280 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl Medium aufgenommen. Die Perizyten wurden auf mit verschiedenen Matrixproteinen beschichtete 12,5 cm² Kulturgefäße ausgebracht. Es wurden mit extrazellulärer Matrix (Becton Dickenson), Fibronectin, Kollagen Typ I, Laminin und mit Poly-D-Lysin beschichtete Kulturgefäße verwendet. Am besten wuchsen die Perizyten auf ECM und Fibronectin beschichteten Kulturgefäßen. Für die Anzucht der Perizyten wurde als Grundmedium IMDM-Medium für RPE verwendet, welches durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren und unterschiedlicher Serumkonzentrationen optimiert wurde. So wurden für FCS im Bereich von 5 - 20% (v/v), für humanes Serum (HS) 1 - 10% (v/v) und Na-Bicarbonat 0,9 - 4,5 mM eingesetzt. Die HRP wuchsen optimal in IMDM mit 15% (v/v) FCS, 5% (v/v) HS und 2,7 mM Na-Bicarbonat. Weiterhin wurden unterschiedliche Wachstums-

faktoren, wie PDGF, VEGF und bFGF getestet. Die besten Wachstumsbedingungen wurden durch die Zugabe des Wachstumsfaktors bFGF (*human basic fibroblast growth factor*) mit einer Konzentration von 2,5 ng/ml erreicht. Zusätzlich wurden kommerziell gekaufte Medien wie DMEM + (D)-Valin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) und Perizyten-Medium (PM, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, USA) ausgetestet, diese waren jedoch für die Anzucht der HRP nicht geeignet. In optimierten IMDM mit bFGF und HS (Tabelle 3.1) bildeten sich nach 2 bis 6 Wochen kleine Zellkolonien, die vital wuchsen und dreimal passagiert werden konnten.

Aufgrund dieser Vorversuche wurde für die etablierte Präparationstechnik und Isolation der HRP ein Gemisch aus Dispase (2,4 U/ml) und Kollagenase (0,35 U/ml) verwendet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt und für 30-60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Zellsat mittels Zentrifugation bei 6000 rpm über ein 70 µm Nylon-Zellsieb (BD Bioscience, Mexiko) in ein Falconröhrchen zentrifugiert. So war es möglich einzelne, sich aus dem Zellverband gelöste, Perizyten zu isolieren. Das Zentrifugat, als auch die im Zellsieb verbliebenen Zellen wurden auf Fibronectin und/oder ECM beschichtete Kulturgefäße gegeben und mit optimiertem Medium inkubiert. Die nach 2 bis 6 Wochen konfluent gewachsenen Perizyten konnten anschließend jede Woche im Verhältnis 1:3 gesplittet und 12- bis 15-mal passagiert werden (siehe Abbildung 3.1). In Abbildung 3.2 sind die kultivierten HRP in RPE-Medium (A) und in optimierten Perizytenmedium (B und C) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die HRP im RPE-Medium nicht wachsen und sich nicht vermehren. Die Zellen sind abgeflacht, und es befinden sich viele Zelltrümmer schon abgestorbener Perizyten im Medium. Trotz Mediumwechsel sind alle HRP in diesen Medium gestorben und konnten nicht passagiert werden. Ähnlich verhielten sich die Perizyten in den kommerziell erworbenen Medien. Mit diesen Medien konnten die HRP isoliert werden. Die Zellen hafteten sich am Kulturgefäßboden an, wuchsen und teilten sich sehr langsam (Verdopplungszeit von 8 Wochen), konnten aber nicht passagiert werden. In Abbildung 3.2 (B) sind in optimierten Perizytenmedium kultivierte HRP (Passage 3) dargestellt, welche in einer 40 bis 50% konfluenten Kultur unterschiedliche große Zellen mit der für Perizyten typischen sternförmigen Morphologie, langen Zellausläufern und dem peripher lokalisierten Kern zeigen. Des Weiteren sind verschiedene Mitosestadien zu erkennen, die auf ein optimales und vitales Wachstum hinweisen. Bei einem hohen Konfluenzgrad bilden die Zellen einen dichten Zellrasen, wobei die Ausläufer der Zellen

auch übereinander wachsen können und eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie zeigen. Die HRP können zusätzlich, wie Endothelzellen, in einem dichten Zellrasen ein sogenanntes cobblestone-artiges Zellmuster ausbilden (Abbildung 3.2 C).

Tabelle 3.1: Optimierte Kultivierungsmedium für humane retinale Perizyten (HRP).

IMDM-Medium mit den Zusätzen	
15% (v/v)	FCS
5% (v/v)	humanes Serum
2,7 mM	Na-Bicarbonat
100 IU/ml	Penicillin
10 mg/ml	Streptomycin
2,5 ng/ml	bFGF

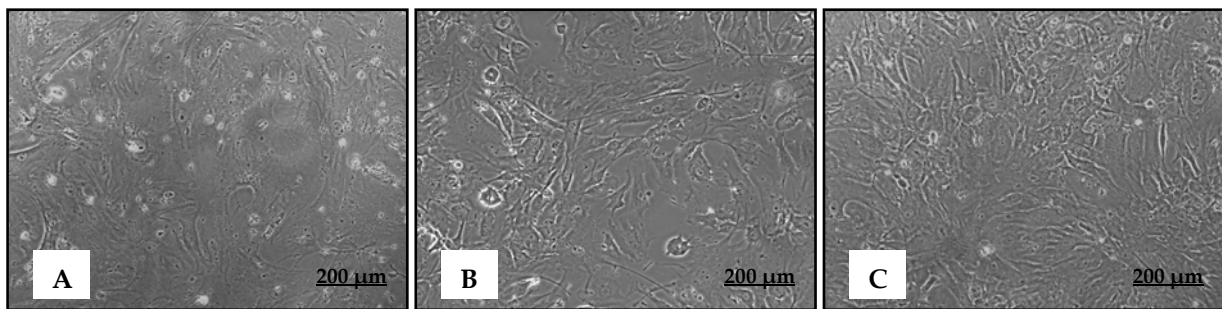


Abbildung 3.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen kultivierter humaner retinaler Perizyten (HRP). (A) HRP in Kulturmedium für RPE. (B) Drei Passagen kultivierte HRP in optimiertem Kulturmedium, 50-60% konfluente Zellrasen. (C) Konfluent gewachsene HRP-Kultur. 100-fache mikroskopische Vergrößerung.

3.1.2 Morphologische Darstellung von HRP mittels May-Grünwald-/Giemsa-Färbung

Zur besseren Darstellung der charakteristischen Morphologie der HRP wurden diese mit May-Grünwald-/Giemsalösung gefärbt. In Abbildung 3.3 ist die variable Zellgröße der Perizyten innerhalb der Zellkultur deutlich zu erkennen. Ferner ist die typische sternförmige Morphologie der retinalen Perizyten mit ihren langen Ausläufern und den peripher lokalisierten Kernen in Abbildung 3.3 (B) dargestellt.

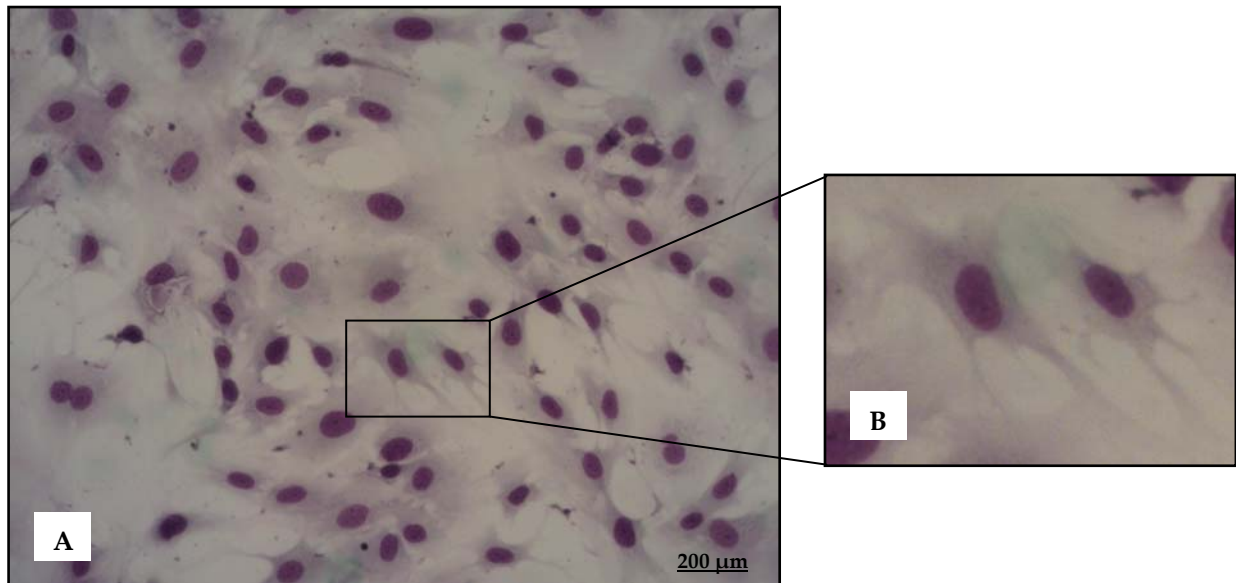


Abbildung 3.3: May-Grünwald-/Giemsa-Färbung kultivierter HRP. (A) Übersicht: Variable Zellgröße der Perizyten innerhalb der Kultur. (B) Bildausschnitt zweier Perizyten mit ihrer charakteristischen sternförmigen Morphologie und den peripher lokalisierten Kernen. 100-fache Vergrößerung.

3.1.3 Charakterisierung von retinalen Perizyten

Das für retinale Perizyten charakteristische Protein α -smooth muscle Aktin und die für glatte Muskelzellen spezifischen Proteine smooth muscle Myosin und Desmin wurden auf Transkriptions- und Proteinebene analysiert. Von den kultivierten Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert. Zusätzlich wurden ein Teil der Zellen mit Aceton/Methanol (2:3) fixiert und auf die spezifischen Zytoskelettproteine (α -smooth muscle Aktin, β -Aktin, Desmin, smooth muscle Myosin, non-smooth muscle Myosin und Vimentin) immunzytochemisch gefärbt. Als Kontrolle dienten ungefärbte fixierte Zellen. Die HRP wurden aus Mikrokapillaren der Retina isoliert, welche durch retinale Endothelzellen und Perizyten gebildet werden. Um auszuschließen keine Mischkulturen aus diesen beiden Zelltypen isoliert zu haben, wurde zusätzlich mit Antikörpern gegen spezifische endotheliale Proteine (CD31, von Willebrand Faktor: vWF) gefärbt. Die Färbung der Zytoskelettproteine Desmin und smooth muscle Myosin diente dem Ausschluss isolierter glatte Muskelzellen, welche ebenfalls in der Retina vorkommen. In retinalen Perizyten werden keine Desmine und smooth muscle Myosine exprimiert, welche aber als Intermediärfilamente in glatten Muskelzellen vorkommen. Zur Kontrolle der Färbung wurde das Zytoskelettprotein Vimentin untersucht, das in allen

Zellen mesenchymalen Ursprung vorkommt. Als positive Kontrolle für endotheliale Proteine wurden HUVEC verwendet.

Der Nachweis der gefärbten Proteine in den Zellen mit den spezifischen Antikörpern für die Zytoskelettproteine ist in Tabelle 3.2 dargestellt. In Perizyten wurden α -smooth muscle Aktin, β -Aktin, non smooth muscle Myosin und Vimentin durch die Färbung nachgewiesen. Dagegen konnte smooth muscle Myosin, Desmin, CD31 und vWF in diesen Zellen nicht detektiert werden. Die HUVEC wurden positiv auf die endothelialen Proteine CD31, vWF und Vimentin gefärbt. Mittels qRT-PCR konnte in den kultivierten HRP α -smooth muscle Aktin detektiert werden, in HUVEC dagegen nicht.

Tabelle 3.2: Darstellung der immunzytochemisch nachgewiesenen Zytoskelettproteine (α -smooth muscle Aktin, β -Aktin, smooth muscle Myosin, non-smooth muscle Myosin, Vimentin, Desmin) und Endothel spezifischer Proteine (CD31, von Willebrand Faktor). (+) positiv gefärbte Zellen, (-) negativ, nicht gefärbte Zellen.

spezifische Antikörper	retinale Perizyten	HUVEC
α -smooth muscle Aktin	+	-
β -Aktin	+	+
smooth muscle Myosin	-	-
non-smooth muscle Myosin	+	+
Vimentin	+	+
Desmin	-	-
CD31	-	+
von Willebrand Faktor (vWF)	-	+

Die in Abbildung 3.4 dargestellten gefärbten Zellen zeigen α -smooth muscle Aktin positive HRP (A1) und α -smooth muscle Aktin negative HUVEC (A2). In beiden Zelltypen konnte Vimentin nachgewiesen werden (D1, D2). Dagegen konnten nur in HUVEC die endothelialen Proteine CD31 und vWF detektiert werden. Dies bestätigt, dass es sich bei den isolierten Zellen um eine homogene Perizytenkultur handelt. Außerdem wurden keine spezifischen Zytoskelettproteine für glatte Muskelzellen in den HRP nachgewiesen.

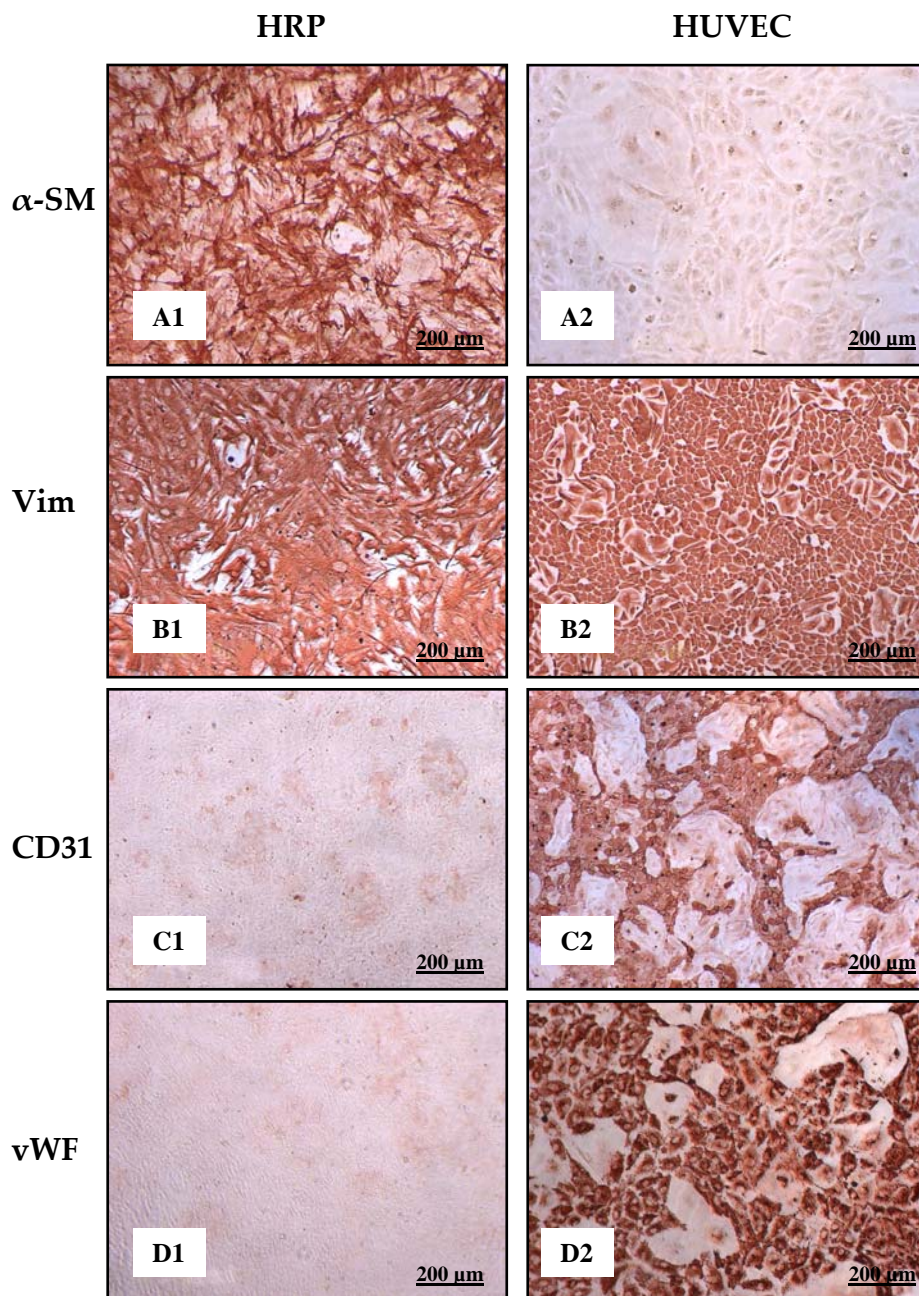


Abbildung 3.4: Immunzytochemische Färbungen von retinalen Perizyten (HRP) und HUVEC. Es wurde spezifisch auf Zytoskelettproteine α -smooth muscle Aktin (A1, A2), Vimentin (B1, B2) und die endothelialen Proteine CD31 (C1, C2) und von Willebrand Faktor (D1, D2) gefärbt. In A1 bis D1 sind gefärbte HRP und in A2 bis D2 gefärbte HUVEC in 100-facher mikroskopischer Vergrößerung dargestellt. α -SM: α -smooth muscle Aktin, vWF: von Willebrand Faktor, Vim: Vimentin.

3.2 Analyse der Infektiosität von HCMV in HRP

3.2.1 Zytopathischer Effekt (CPE)

Um die Infizierbarkeit der Perizyten mit HCMV zu untersuchen, wurden diese bei einer Konfluenz von 60 - 80% mit den zwei Virusstämmen HCMV-AD169 und HCMV-Hi91, wie unter 2.2.2. beschrieben, infiziert. Es wurden unterschiedliche MOIs (*multiplicity of infection*) von 0,01 bis 10 eingesetzt. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch auf einen CPE, erkennbar an den aufgequollenen, vergrößerten und kugeligen Zellen, überprüft. Nach 24 h und 48 h konnte bei keiner MOI eine morphologische Veränderung der Perizyten festgestellt werden. Nach 72 h konnten bei einer MOI zwischen 2 und 10 einzelne Zellen gefunden werden, die einen CPE zeigten. Nach 8 - 10 Tagen wurden keine weiteren Veränderungen des CPE in den kultivierten Perizyten festgestellt. Für alle weiteren Versuche wurde daher zur Infektion der HRP eine MOI von 2 verwendet. Als Kontrollzellen wurden humane Vorhautfibroblasten (HFF) und retinale Pigmentepithelzellen (RPE) verwendet. Diese wurden unter gleichen Bedingungen mit den beiden Virusstämmen infiziert. Die HFF zeigten bereits nach 24 h bei einer MOI von 0,1 einen deutlichen CPE. Die infizierten RPE zeigten, wie die HRP, erst nach mehreren Tagen nur vereinzelte Zellen mit CPE bei einer MOI zwischen 2 und 10.

3.2.2 Mikrokinematografische Aufnahmen

Aufgrund der Vorversuche wurden die Zellen mit einer MOI von 2 infiziert und mittels Mikrokinematografie für 15 Tage gefilmt. Nach Auswertung des Films konnten nach 3 bis 8 Tagen einzelne Zellen, die einen deutlichen CPE zeigten, gefunden werden. Auch nach 15 Tagen wurden die HRP nicht lysiert. Eine Zunahme des CPE konnte zu späteren Zeitpunkten nicht festgestellt werden. Als Vergleichszellen dienten die HFF und RPE, welche ebenfalls mit einer MOI von 2 infiziert wurden. Nach 24 h war bereits in der HFF-Kultur ein deutlicher CPE zu erkennen, nach 72 h waren nahezu alle HFF abgestorben. Die RPE verhielten sich wie die Perizyten. In der Abbildung 3.5 sind die drei Zelltypen nach 3 Tagen Infektion mit HCMV-Hi91 dargestellt. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Mockzellen gefilmt. In (A) sind deutlich aufgequollene, große CPE zeigende HFF und bereits lysierte Zellen zu sehen. In (B) sind RPE und in (C) HRP dargestellt. Beide Zelltypen zeigen keinen CPE. In (D) sind HRP nach 8 Tagen Infektion mit HCMV-Hi91 (MOI 2) dargestellt, wobei einzelne aufgequollene Zellen mit einem CPE zu erkennen sind.

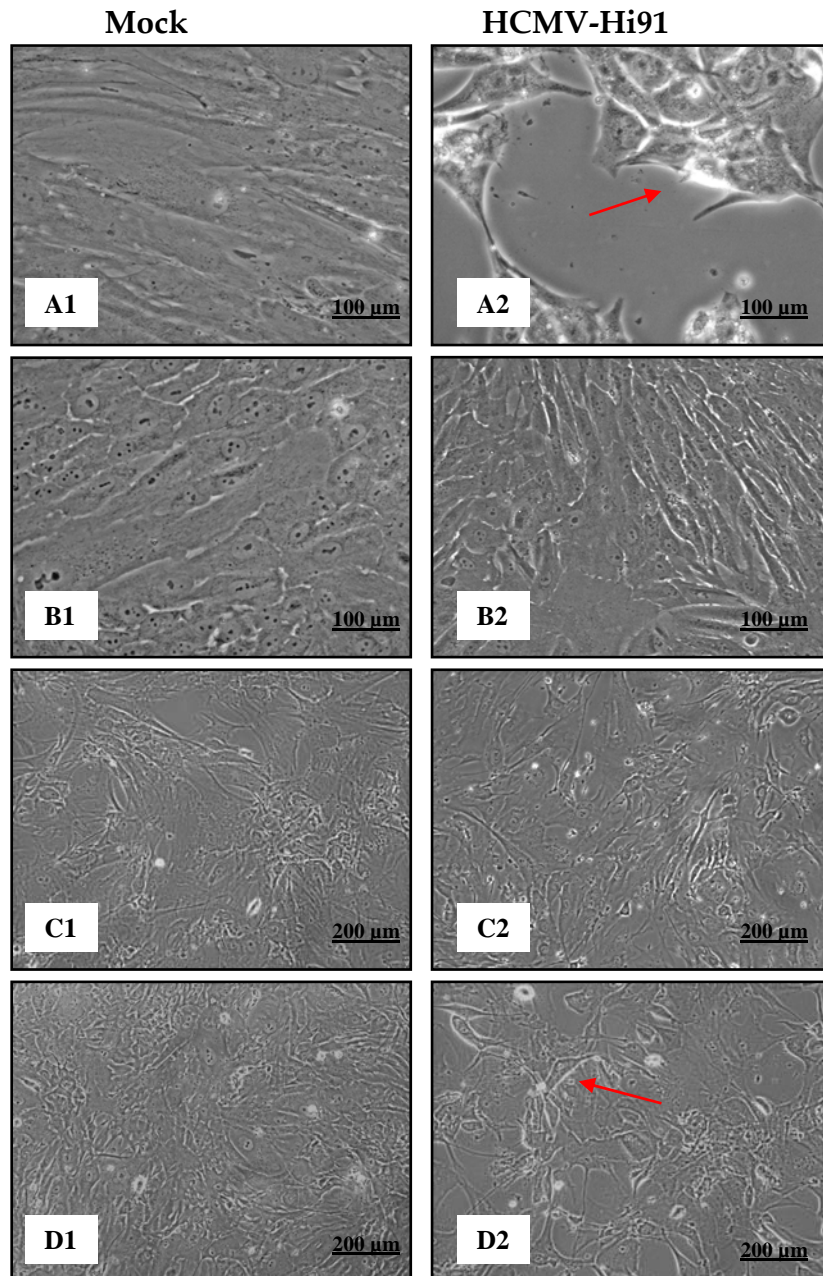


Abbildung 3.5: Mikrokinematografische Aufnahmen nach 3 und 8 Tagen (p.i.) nach Infektion mit HCMV-Hi91 (MOI 2). (A) HFF 3d p.i.; (B) RPE 3d p.i.; (C) HRP 3d p.i.; (D) HRP 8d p.i.. In A1 bis D1 sind uninfizierte Mockzellen und in (A2 bis D2) mit HCMV-infizierte Zellen dargestellt. Die roten Pfeile weisen auf Zellen mit deutlichen CPE hin. Die mikrokinematografischen Aufnahmen wurden dreimal durchgeführt. (A1,A2, B1 und B2) 200-fache, (C1, C2, D1 und D2) 100-fache mikroskopische Vergrößerung.

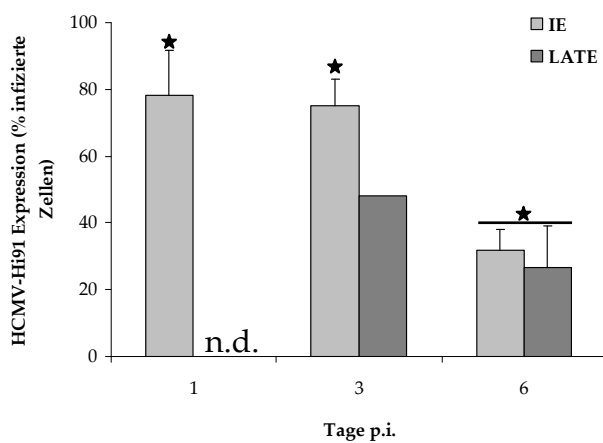
3.2.3 Analyse der IE und *late* Expression mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und qRT-PCR

Zur Überprüfung, ob HCMV die retinalen Perizyten infizieren kann und in ihnen repliziert, wurden zu den Zeitpunkten 6 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Infektion mit HCMV-Hi91 und –AD169 die Zellen mit Aceton/Methanol (2:3) fixiert und zusätzlich Gesamt-RNA aus nicht fixierten Zellen für die qRT-PCR-Analyse mittels TaqMan isoliert. Als positive Kontrolle wurden HFF mitgeführt. Mittels spezifischer Antikörper für die viralen Proteine *immediate early* (IE) und *late* (gB) wurden die fixierten Zellen anschließend, wie unter 2.2.4 beschrieben, gefärbt. Als Sekundärantikörper diente ein Texas Red markierter Antikörper. So konnten die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Zur Kontrolle wurden die zelluläre DNA mit DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt (Abbildung 3.7). Die DAPI und IE-gefärbten Zellkerne sowie die *late* gefärbten Zellen wurden ausgezählt. Anschließend wurde die HCMV-Expression durch die prozentuale Angabe infizierter Zellen ermittelt (Abbildung 3.6). Nach 24 Stunden konnten in 78% der Perizyten und in 90% der HFF virale IE-Proteine nachgewiesen werden. Dagegen wurden keine *late* Proteine detektiert. Nach drei Tagen wurden 75 % der Perizyten positiv auf IE-Proteine und 48% der infizierten Zellen auf *late* Proteine gefärbt. Somit wurde eindeutig die Replikation des Zytomegalievirus in Perizyten nachgewiesen. In den Vorhautfibroblasten konnten dagegen 99% positiv gefärbte IE und 96% positiv gefärbte *late* Zellen ermittelt werden (Abbildung 3.6). Die HFF waren bereits nach sechs Tagen vollständig lysiert, so dass keine Färbung der Zellen möglich war. Dagegen war eine Abnahme der viralen Proteine und somit der viralen Expression nach sechs Tagen Infektion in HRP detektierbar. Die gleichen Ergebnisse wurden durch die Infektionsversuche mit HCMV-AD169 erhalten. Mittels qRT-PCR konnte die signifikante Expression von IE mit einem FC (*fold change*) von 6863,12 ($p < 0,05$) bestätigt werden. Nach 72 h war ein signifikanter Anstieg des *late* Proteins mit einem FC von 6950 detektierbar. Für beide virale Gene war nach 144 h p.i. eine Abnahme der Expression nachweisbar. Die Ergebnisse der qRT-PCR werden in Tabelle 3.3 dargestellt. Zusammenfassend kann man sagen, dass humane retinale Perizyten mit HCMV (MOI 2) infizierbar sind, vereinzelt einen CPE zeigen und die viralen Proteine IE und *late* in ihnen nachzuweisen sind.

Tabelle 3.3: Relative Genexpression der viralen IE und *late* Gene der mit HCMV-Hi91 infizierten Perizyten. Dargestellt sind die Expressionen als *fold change* (FC) zu den Zeitpunkten 24 h, 72 h und 144 h nach Infektion; n=3, Mittelwert \pm Standardabweichung, $p < 0,05$. n.d.: nicht detektiert.

Gen	Stunden p.i.		
	24	72	144
IE	6863,12 \pm 57,23	5500 \pm 112	256 \pm 22,03
<i>late</i>	n.d.	6950 \pm 164,17	187 \pm 12,58

(A) HRP



(B) HFF

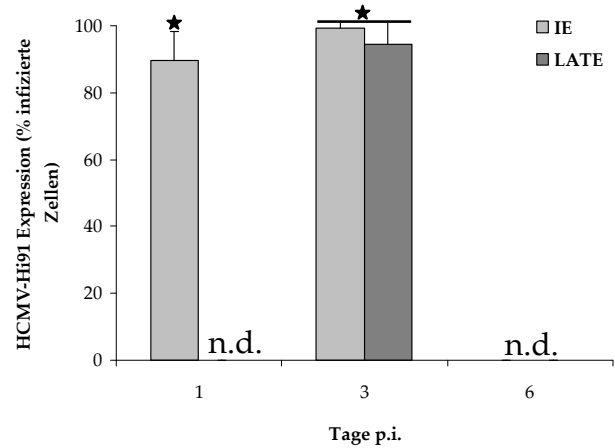


Abbildung 3.6: HCMV-Hi91 Expression in HRP (A) und HFF (B). Die Zellen wurden mit HCMV-Hi91 (MOI 2) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten auf virale IE und *late* Proteine gefärbt. Die positiv gefärbten Zellen wurden ausgezählt und die Expression prozentual ermittelt. Aufgetragen sind die HCMV-Hi91 infizierten Zellen in % gegen die Zeit (Tage p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, * $p < 0,05$, n.d.: nicht detektiert.

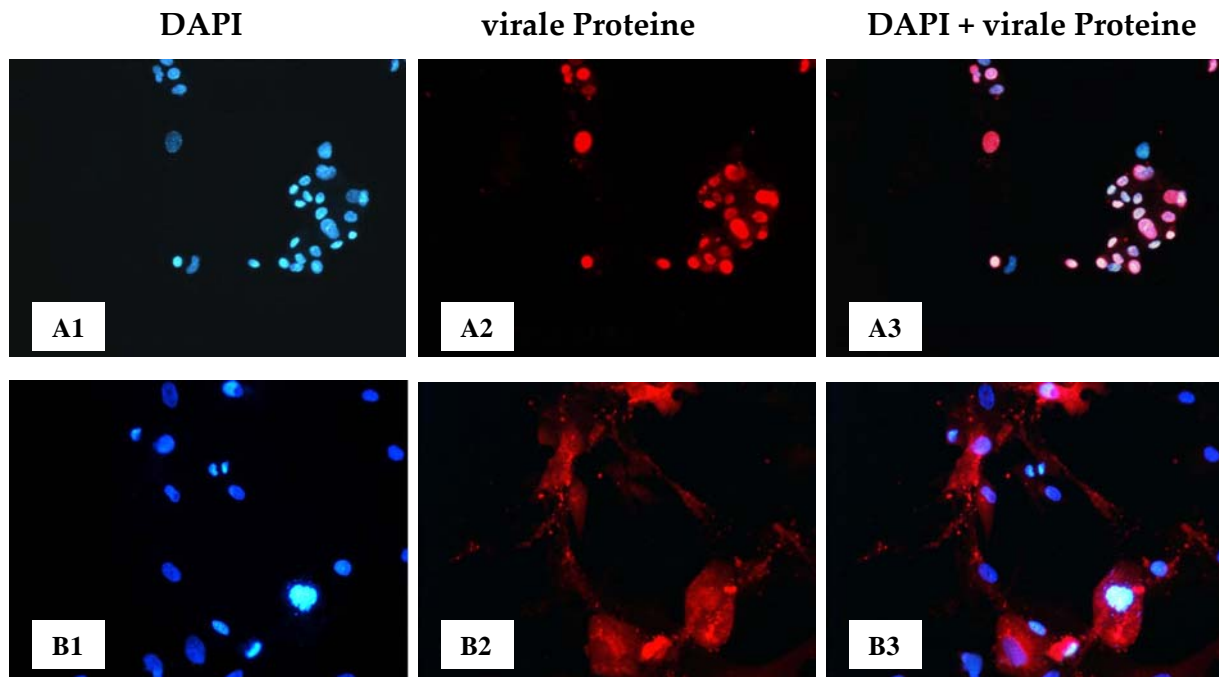


Abbildung 3.7: HCMV-Hi91 Expression in HRP. Die Zellen wurden mit HCMV-Hi91 (MOI 2) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten auf virale IE und *late* Proteine gefärbt. Als Kontrolle wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. (A) Färbung 24 h p.i., (B) Färbung 72 h p.i.. Es sind DAPI gefärbte Zellkerne (A1, B1), auf IE Proteine gefärbte HRP in (A2) und *late* gefärbte HRP (B2) dargestellt. In (A3) und (B3) sind Aufnahmen der DAPI und viralen Proteine gefärbten HRP übereinander gelegt.

3.2.4 Titration

In den mit HCMV infizierten Perizyten konnte mittels Immunzytochemie und qRT-PCR die Expression viraler Proteine nachgewiesen werden. Um zu ermitteln, ob infektiöse Viruspartikel gebildet und in welcher Menge diese produziert werden, wurde eine Titerbestimmung vorgenommen. Die HRP wurden mit HCMV infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1d, 3d, 6d und 9d) gestoppt und die Zellen bei -80°C weggefroren. Nach dreimaligen Auftauen und Einfrieren wurden die virushaltigen Zelllysate zur Titration aufbereitet. Die virushaltigen Überstände wurden in einer Verdünnungsreihe auf HFF gegeben und diese für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die HFF immunhistochemisch auf das virale IE Protein gefärbt, die positiven Zellkerne gezählt und die Virustiter berechnet. Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, kann HCMV in HRP replizieren, und es werden infektiöse Viruspartikel produziert. Nach 3d wurden $2,8 \times 10^3$ IEFU/ml (*immediate early forming units*), nach 6d $1,3 \times 10^4$ IEFU/ml und nach 9d $3,5 \times 10^4$ IEFU/ml produziert. Die gemessenen Titer sind im Vergleich zu den von Vorhautfibroblasten produzierten Virusmengen eher gering. Vorhautfibroblasten zeigten bereits am Tag 4 p.i. einen Titer von 10^5 IEFU/ml. In RPE wurden am Tag 9 5×10^4 IEFU/ml infektiöse

Viruspartikel nachgewiesen, was ungefähr den erhaltenen Titern für HRP entspricht. Aufgrund der starken Lyse der HFF durch HCMV, bereits am Tag sechs, konnte zum Zeitpunkt Tag 9 keine Titerbestimmung für diese Zellen durchgeführt werden.

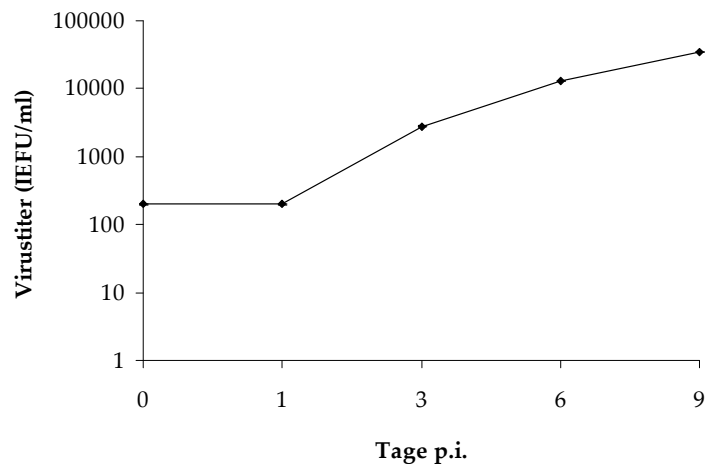
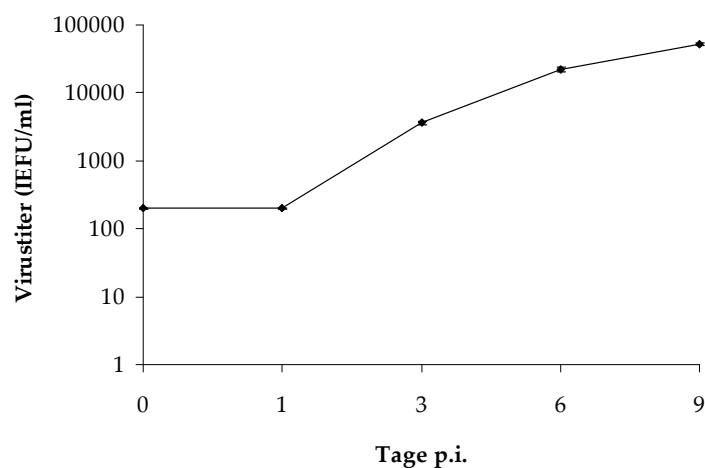
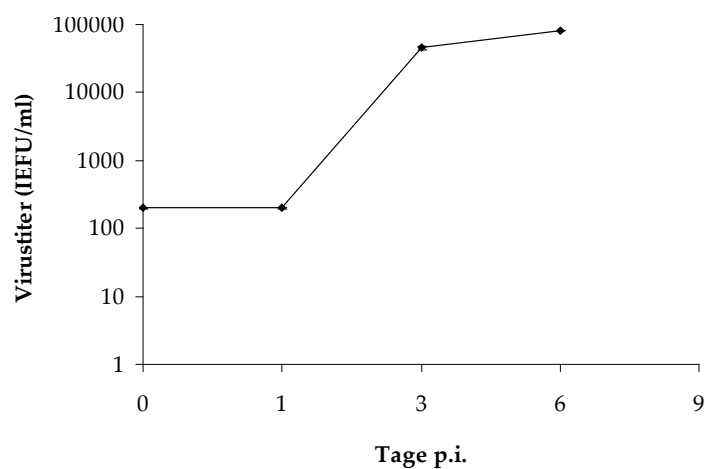
(A) HRP**(B) RPE****(C) HFF**

Abbildung 3.8: Virustitration. Die HRP (A), RPE (B) und HFF (C) wurden mit HCMV (MOI 2) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen bei -80°C weg gefroren und die Virusüberstände hergestellt. Zur Bestimmung produktiver Viruspartikel wurden HFF mit den Überständen infiziert, die positiv gefärbten IE Zellkerne ausgezählt und die jeweiligen Virustiter ermittelt. Aufgetragen ist der Virustiter (IEFU/ml) gegen die Zeit (Tage p.i.). $n=4$, Mittelwert \pm SA.

3.2.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen HCMV-infizierter HRP

Um in den infizierten Perizyten intakte, behüllte Viruspartikel im Zytoplasma bzw. noch unvollständige, nicht behüllte Viren nachzuweisen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Nach 72 h und 96 h konnten in den mit HCMV-Hi91 und AD169 infizierten Perizyten vollständige Viruspartikel nachgewiesen werden. In Abbildung 3.9 werden verschiedene Reifestadien von Viruspartikel im Zellkern und im Zytoplasma der Perizyten dargestellt. Im Zellkern befinden sich HCMV-Nukleokapside (B). Im Zytoplasma sind behüllte Viruspartikel und *dense bodies* nachweisbar (B und C), welche ein Indikator für eine produktive Virusinfektion sind. Weiterhin konnten sich von der Zellmembran abschnürende reife Viruspartikel nachgewiesen werden (D), die ebenfalls ein Indiz für eine effektive Virusinfektion sind. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Mockzellen verwendet.

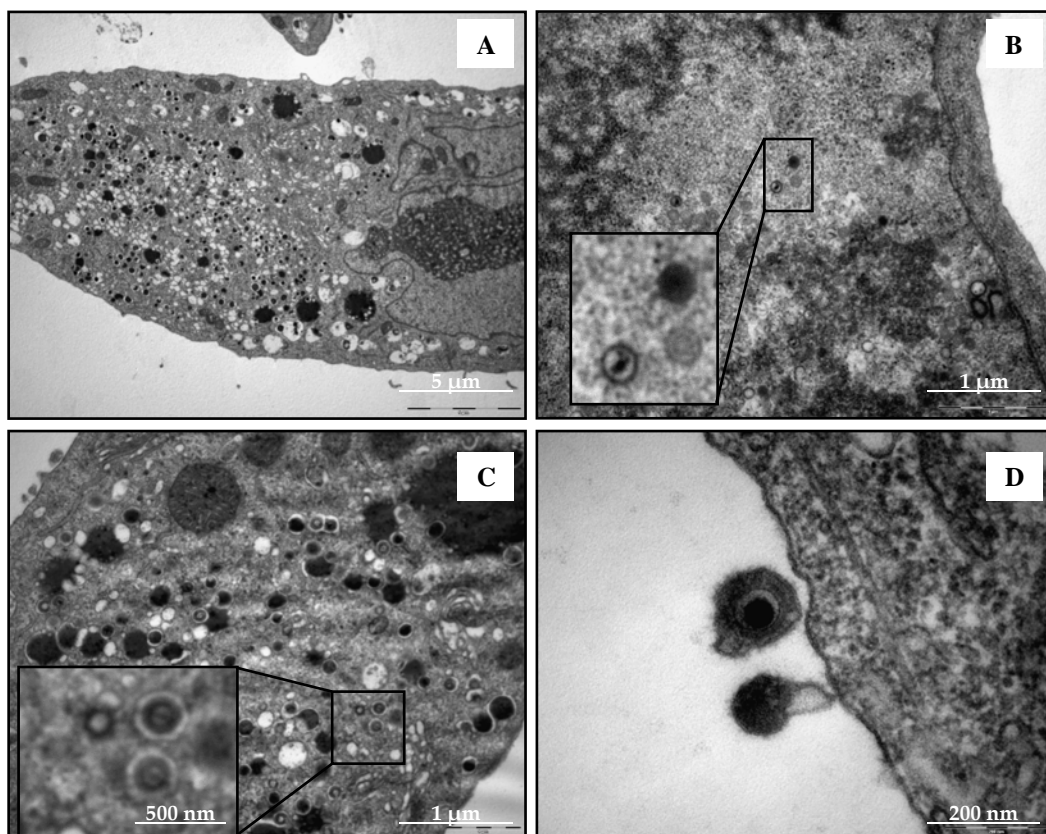


Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen HCMV infizierter (MOI 2) HRP 96 h p.i. (A) Übersicht einer uninfizierten Mockzelle (6000-fache Vergrößerung) (B) Übersicht eines Teils des infizierten Perizytenzellkerns mit HCMV-Nukleokapsiden (vergrößerter Bildausschnitt) und behüllter Viruspartikel im Zytoplasma, (30.000-fache Vergrößerung) (C) Vergrößerte Darstellung umhüllter Viruspartikel im Zytoplasma und der sogenannten „dense bodies“ (ein Indikator für eine produktive Virusinfektion) (D) Abschnürung reifer Viruspartikel von der Zellmembran (150.000-fache Vergrößerung).

3.3. Expression von Transkriptionsfaktoren durch eine HCMV Infektion

Bei einer HCMV-Infektion werden zelluläre Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B, AP-1 und SP-1 aktiviert (Boldogh et al., 1990). Diese Transkriptionsfaktoren gelten als schnell aktivierbare Regulatoren verschiedener biologischer Abwehrprozesse, z.B. im Rahmen der Antwort auf proinflammatorische Stimuli (Barnes et al., 1997). NF- κ B verändert durch seine Bindung an Promotorregionen die Transkription verschiedener Gene wie z.B. für Chemokine/Zytokine, Adhäsionsmoleküle und andere Transkriptionsfaktoren (Pahl, 1999).

3.3.1 Expressionsanalyse der NF- κ B Untereinheiten p50 und p65

Um zu untersuchen, ob eine HCMV-Infektion in retinalen Perizyten die Untereinheiten p50 und p65 des Transkriptionsfaktors NF- κ B aktiviert, wurden Zytoplasma- und Kernproteinextrakte von infizierten und nicht infizierten HRP isoliert. Als positive Kontrolle wurden die Zellen mit TNF- α , welcher NF- κ B p50 und p65 aktiviert, stimuliert. Zur Kontrolle dienten RPE und HFF, welche bereits in unserer Arbeitsgruppe auf die Aktivierung von NF- κ B p50 und p65 bei einer HCMV-Infektion untersucht wurden (Cinatl et al., 2001). Die Kernproteinextrakte wurden mittels des *TransAM NF κ B p65 und p50 Chemi Kits* (Active Motif, California, USA) auf die Expression der Transkriptionsfaktoren untersucht (Abbildung 3.10). Zusätzlich wurden die infizierten Zellen und nicht infizierten Mockzellen mithilfe von Immunzytochemie spezifisch auf die Transkriptionsfaktoren gefärbt, um deren Lokalisation im Zytoplasma oder Zellkern zu detektieren (Abbildung 3.11). In HFF konnte eine NF- κ B p50 und p65 Aktivierung nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, wurden beide Transkriptionsfaktoren bereits nach 30 min im Zellkern detektiert. Ein signifikanter Anstieg war bis zu 24 h nach der Infektion nachweisbar ($p < 0,05$). Dagegen war nach Infektion der RPE und HRP kein Anstieg der beiden Untereinheiten nachzuweisen. Nur die positiven Kontrollen, die mit TNF- α stimuliert wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung beider Untereinheiten im Zellkern, wobei p65 stärker exprimiert wurde. Alle Ansätze wurden zusätzlich mit HCMV-UV inaktivierten Virus durchgeführt. Diese verhielten sich wie die Mockansätze der nicht infizierten Zellen.

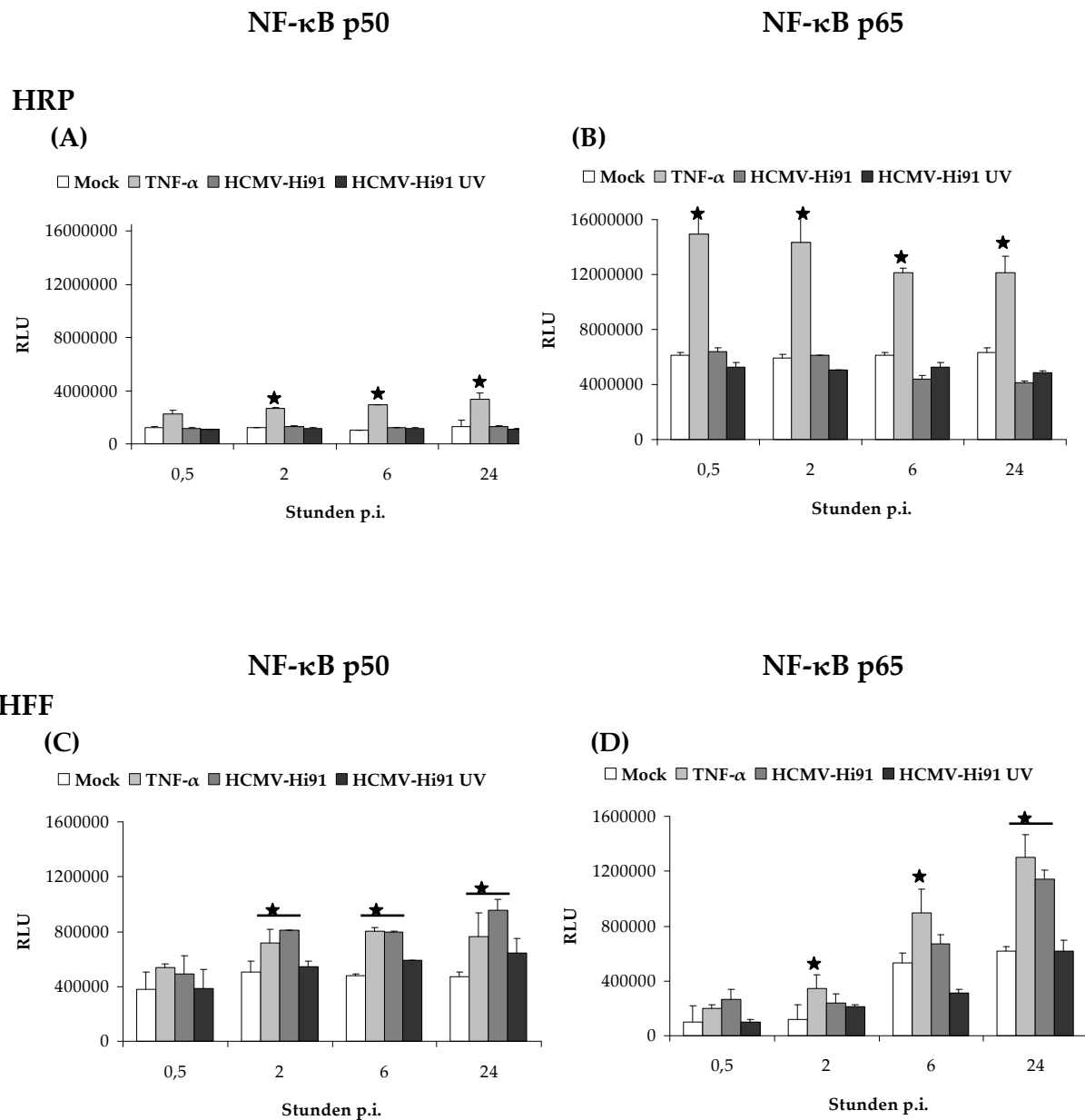
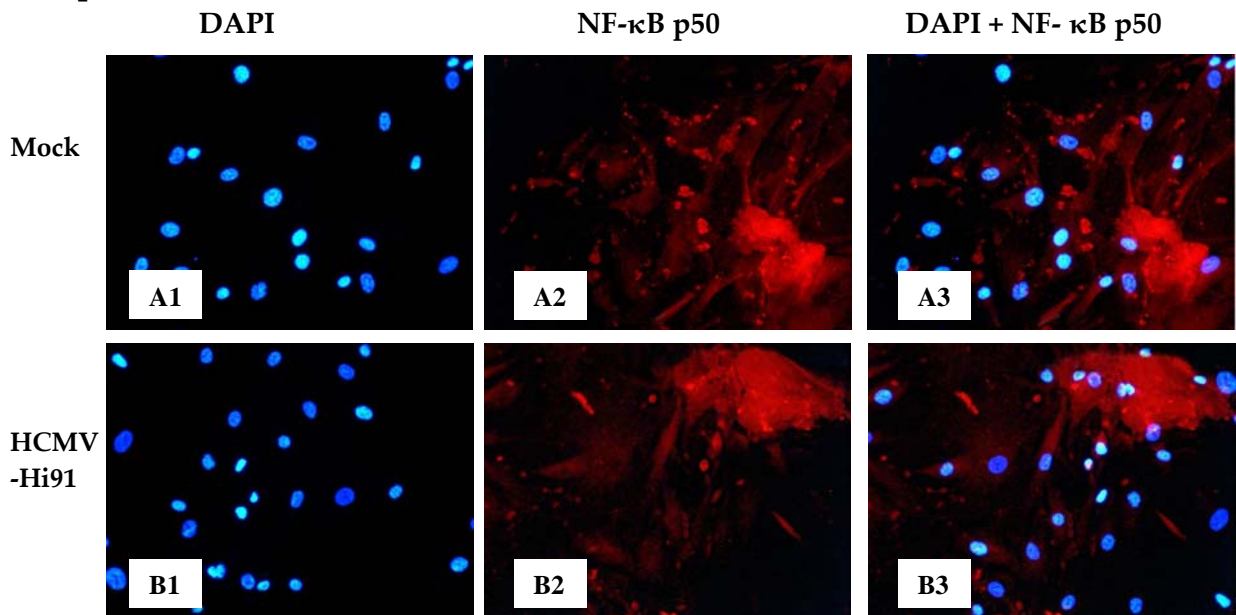


Abbildung 3.10: Übersicht der Aktivierung von NF-κB p50 und p65 nach einer HCMV-Infektion. Die Kernproteinextrakte der infizierten Zellen, Mockzellen und mit TNF-α stimulierten Zellen wurden mittels *TransAM NFκB p65 und p50 Chemi Kit* (Active Motif, California, USA) auf die Expression der beiden Untereinheiten untersucht. (A) Bestimmung von NF-κB p50 in HRP. (B) Bestimmung von NF-κB p65 in HRP. (C) Bestimmung von NF-κB p50 in HFF. (D) Bestimmung von NF-κB p65 in HFF. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Aufgetragen sind die Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert ± SA, * p<0,05.

24 h p.i



72 h p.i

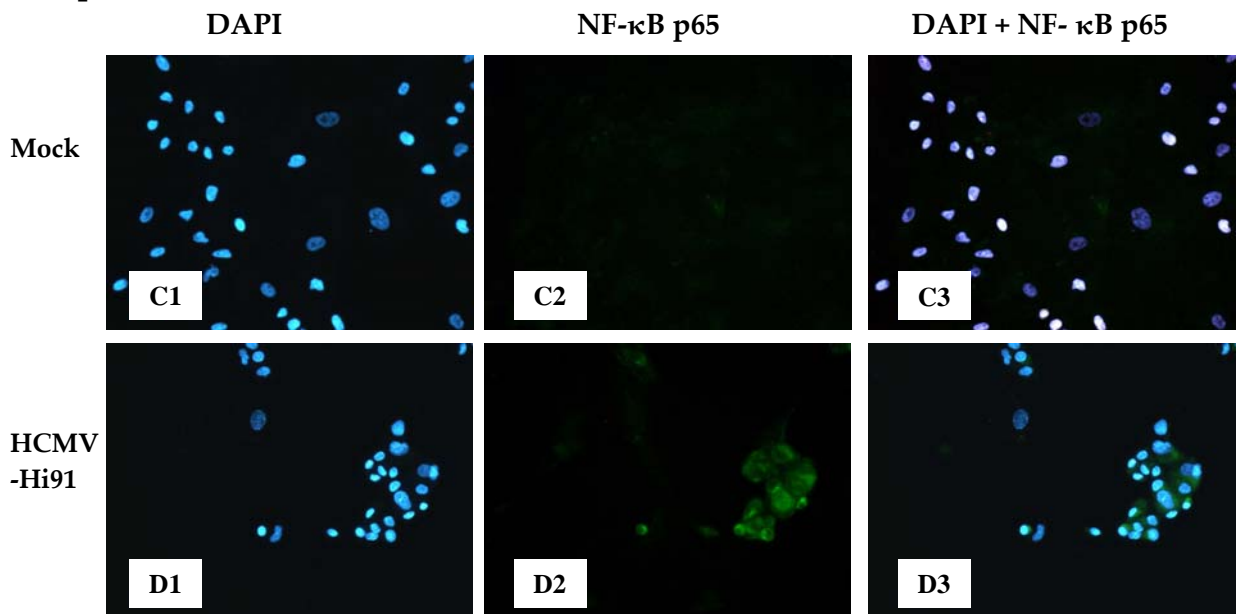


Abbildung 3.11: Lokalisation von NF- κ B p50 und p65 24 h nach einer HCMV-Infektion. Die HRP wurden mit HCMV-Hi91 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit spezifischen Antikörpern gegen NF- κ B p50 (A2, B2) und p65 (C2, D2) gefärbt, als Kontrolle wurde die Zellkerne mit DAPI gefärbt (A1, B1, C1, D1). Mockzellen (A1-A3) 24 h p.i., NF- κ B p50 gefärbt und mit HCMV-Hi91 infizierte HRP (B1-B3) 24 h p.i., NF- κ B p50 gefärbt. Mockzellen (C1-C3) 24 h p.i., NF- κ B p65 gefärbt und mit HCMV-Hi91 infizierte HRP (D1-D3) 24 h p.i., NF- κ B p65 gefärbt. In A3, B3, C3 und D3 sind die Aufnahmen der mit DAPI und NF- κ B gefärbten Zellen übereinander gelegt.

3.3.2 Western-Blot Analyse der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SP-1

Um zu überprüfen, ob eine HCMV-Infektion in Perizyten andere Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und SP-1 aktiviert, wurden Kernproteinextrakte und Zytoplasmaextrakte infizierter und nicht infizierter HRP mittels Western-Blot Analyse untersucht.

AP-1 ist ein Heterodimer-Komplex, welches aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Familien besteht. Es konnte gezeigt werden, dass c-Jun und c-Fos, welche die Hauptuntereinheiten von AP-1 sind, während einer HCMV-Infektion fusionieren und an zelluläre Promotoren binden (Hagemeyer et al., 1992; Boldogh et al., 1993). SP-1 enthält ein Transkriptionsfaktor Zinkfingerproteinmotiv, mit dem es direkt an die DNA bindet und die Gentranskription verstärkt.

Die Western Blot-Analysen zeigten in HCMV-infizierten Perizyten eine Aktivierung von AP-1, aber nicht von SP-1. Zusätzlich wurden die Analysen mit HCMV-Hi91 UV-inaktivierten Virus durchgeführt. Diese verhielten sich wie die Mockansätze der nicht infizierten Zellen. Als Kontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen, um sicherzustellen dass gleiche Mengen an Zelllysate verwendet wurden. Wie in Abbildung 3.12 dargestellt, war ein deutlicher erhöhter Nachweis von c-Jun und c-Fos im Kernextrakt der mit HCMV-Hi91 und TNF- α behandelten Perizyten detektierbar. Beide Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 konnten bereits nach 2h im Zellkern nachgewiesen werden, jedoch am stärksten 6h nach der Infektion (Abbildung 3.12).

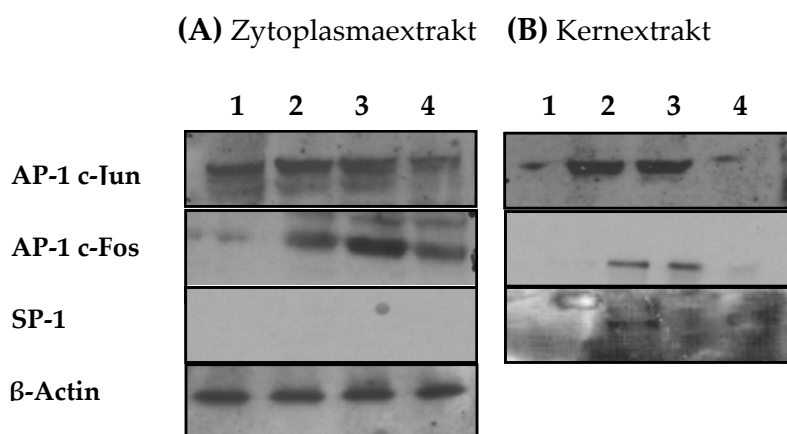


Abbildung 3.12: Detektion der Transkriptionsfaktoren AP-1 und SP-1 in HRP 6h nach einer HCMV-Infektion mittels Western-Blot Analyse. Die Kernproteinextrakte (A) und Zytoplasmaextrakte (B) wurden auf die Expression der Untereinheiten von AP-1 c-Jun und c-Fos und den Transkriptionsfaktor SP-1 untersucht. Als Kontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen. Es wurden Lysate von Mockzellen (1), von mit TNF- α stimulierten Zellen (2), von mit HCMV-Hi91(3) und HCMV-Hi91 UV infizierten Zellen verwendet.

3.4 Analysen der ICAM-1 und Integrinexpression mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 ist wichtig für die Infiltration und das Anhaften von Leukozyten der infizierten Zellen, was für inflammatorische Prozesse während einer HCMV-Retinitis bedeutend ist. Zur Untersuchung der Expression verschiedener Integrine, des EGF-Rezeptors und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, wurden die HRP mit HCMV (MOI 2) infiziert. Als positive Kontrolle wurden die retinalen Perizyten mit Interferon- γ , das die Expression von ICAM-1 induziert, inkubiert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz auf die Expression der Proteine untersucht. Für den Nachweis einer ICAM-1-Überexpression nach einer HCMV-Infektion wurde zusätzlich eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt.

3.4.1 Analyse der ICAM-1 Expression

Nach einer 24 h und 72 h Infektion mit HCMV konnte eine Hochregulation von ICAM-1 nachgewiesen werden, wobei die höchste Expression nach 72 h zu detektieren war. Diese Ergebnisse wurden mittels Fluoreszenzfärbung, Durchflusszytometrie sowie qRT-PCR bestätigt. In Tabelle 3.4 wird die relative Genexpression von ICAM-1 in Perizyten als FC (*fold change*) nach 6 h, 24 h und 72 h Infektion mit HCMV-Hi91 und HCMV-AD169 dargestellt. Bereits nach 6 h ist die Genexpression durch die Infektion mit beiden Virusstämmen erhöht, nach 24 h 13,35-fach. Nach 72 h ist die Expression um das 40,56- fache (Hi91) bzw. das 55,65- fache (AD169) erhöht.

Tabelle 3.4: Relative Genexpression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in HRP. Dargestellt sind die Expressionen als *fold change* (FC) zu den Zeitpunkten 6 h, 24 h und 72 h nach Infektion mit HCMV-Hi91 und AD169 (p.i.). Als positive Kontrolle wurden die HRP mit Interferon- γ behandelt. n=3, Mittelwert \pm SA, p<0,05.

	ICAM-1 Expression (Stunden p.i.)		
	6	24	72
INF- γ	157,59 \pm 18,34	389,9 \pm 87,52	202,6 \pm 20,89
HCMV-Hi91	7,05 \pm 1,21	13,35 \pm 1,13	40,56 \pm 4,45
HCMV-AD169	2,3 \pm 0,37	13,72 \pm 2,15	55,65 \pm 8,12

In Abbildung 3.13 wird die ICAM-1 Expression mittels Durchflusszytometrie dargestellt. Die Daten bestätigen die erhöhte Genexpression von ICAM-1 in infizierten HRP. Nach 24 h ist eine Erhöhung von ICAM-1 in den Perizyten detektierbar, welche nach 72 h deutlich mit 232,11 FIE (Fluoreszenz-Intensitätseinheiten) nach HCMV-Hi91 Infektion und 279,79 FIE nach HCMV-AD169 Infektion ansteigt. In der Abbildung 3.14 ist die Immunzytochemische Färbung der HRP nach 72h Infektion mit HCMV-Hi91 und AD169 dargestellt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Mockzellen.

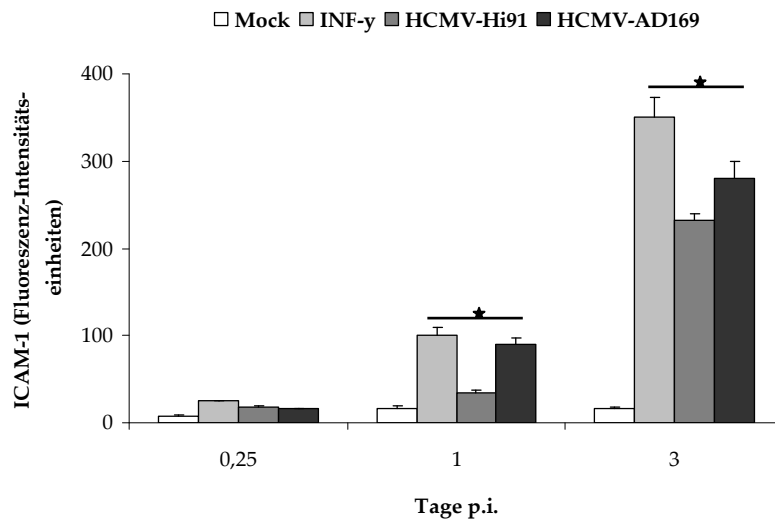


Abbildung 3.13: Analyse der ICAM-1 Expression mittels Durchflusszytometrie. Die Perizyten wurden mit HCMV-Hi91 und AD169 (MOI 2) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem FACS-Antikörper gegen ICAM-1 gefärbt. Als positive Kontrolle für die ICAM-1 Expression wurden die Zellen mit Interferon- γ (INF- γ) inkubiert. Aufgetragen sind die Fluoreszenzeinheiten gegen die Zeit (Tage p.i.).

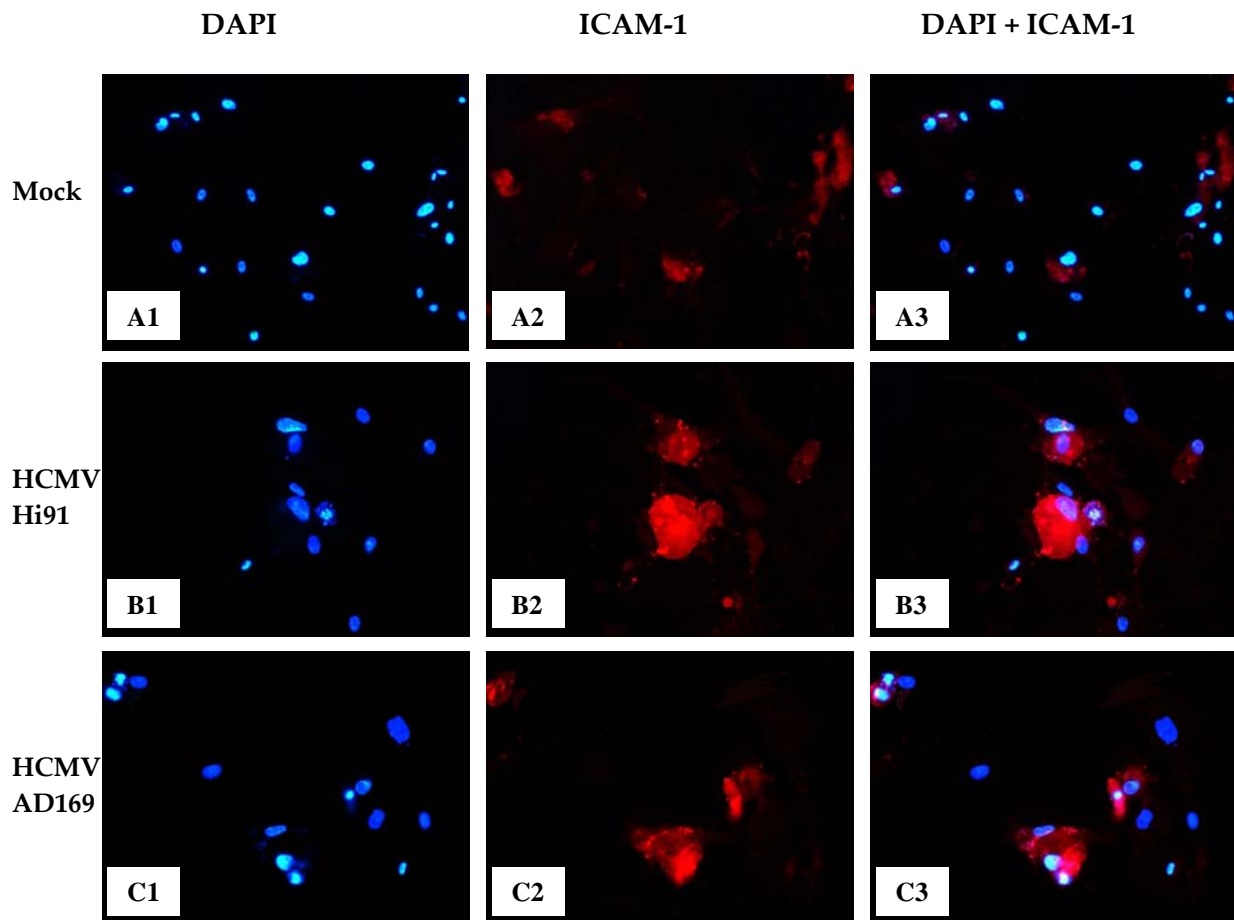


Abbildung 3.14: Immunzytochemische Färbung der ICAM-1 Expression in HRP nach 72 h HCMV-Infektion. Als Kontrollzellen dienten nicht infizierte Mockzellen. Die Zellkernfärbung mit DAPI (A1, B1, C1) diente als Kontrollfärbung (A1-A3) nicht infizierte Mockzellen (B1-B3) mit HCMV-Hi91 infizierte HRP (C1-C3) mit HCMV-AD169 infizierte HRP. In A3, B3 und C3 sind die DAPI gefärbten mit den ICAM-1 gefärbten Bildern übereinander gelegt.

3.4.2 Analyse der EGF-Rezeptor- und der Integrinexpression während einer HCMV-Infektion

Für eine HCMV-Infektion sind der EGF-Rezeptor und spezifische Integrine von großer Bedeutung. Es wird vermutet, dass die Adsorption des Virus und die Fusion mit der Zellmembran über diese vermittelt wird (Feire et al., 2004; Wang et al., 2005). So fungieren die Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ als HCMV-„Eintritts“-Rezeptoren und Signalvermittler während der Penetration (Feire et al. 2004). Der EGF-R und das Integrin $\alpha v\beta 3$ werden während der frühen Phase der HCMV-Infektion überexprimiert und treten in Wechselwirkung miteinander. Sie spielen somit eine wichtige Rolle beim Viruseintritt, der

Herabregulation von RhoA, den Stressfaserabbau und der viralen Kernmigration (Wang et al., 2005). Durch die Bindung von HCMV an die Integrine und den EGF-R werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, wie z. B. die PI3-K- und Src-Signalwege, welche die Apoptose der Zellen inhibieren oder die Zellen zum Zellzyklusarrest bringen. Der Einfluss von Integrinen und des EGF-R in HCMV-infizierten Perizyten wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Nach 10 min, 30 min, 2 h, 6 h, 24 h, 72 h und 96 h p.i. wurden die Zellen spezifisch mit einem EGF-R Antikörper gefärbt und analysiert. Zu allen Zeitpunkten wurde der EGF-Rezeptor im Vergleich zur uninfizierten Mockkontrolle herunterreguliert. In Abbildung 3.15 sind die Expressionen zu den Zeitpunkten 6 h bis 96 h p.i. dargestellt. Nach 96 h p.i. steigt EGF-R Expression wieder an (8 RFU), erreicht jedoch nicht das Expressionsniveau der Mockzellen von 37 RFU. Es wurden daher weitere Expressionsstudien zu späteren Zeitpunkten (6 d bis 12 d p.i.) durchgeführt, diese zeigten aber auch keine Veränderung in der EGF-R-Expression.

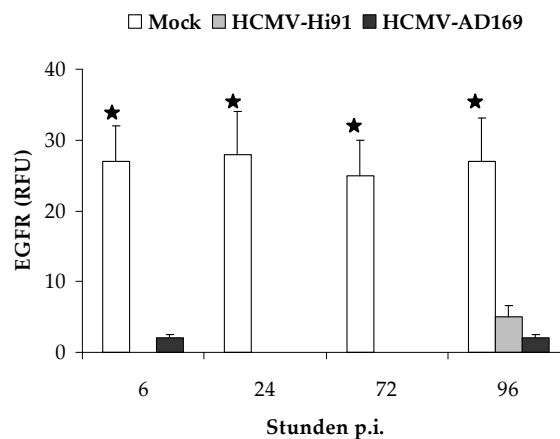


Abbildung 3.15: Analyse der EGF-R Expression mittels Durchflusszytometrie. Die HRP wurden mit HCMV (MOI 2) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem spezifischen EGF-R Antikörper gefärbt und analysiert. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Mockzellen verwendet. Aufgetragen sind die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

Mittels Durchflusszytometrie wurden mit HCMV infizierte HRP auf die Expression der Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$ und $\alpha \nu\beta 3$ untersucht. Zu den Zeitpunkten 10 min, 30 min, 2 h, 6h, 24 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und die Integrinexpression analysiert. Zur Kontrolle wurden nicht infizierte Mockzellen verwendet. In Abbildung 3.16 sind die Expressionen zu den Zeitpunkten 6 h, 24 h, 72h und 96 h dargestellt. Nach 10 min bis 6 h ist in HCMV-Hi91 infizierten HRP eine signifikante (1,46-fache) Erhöhung des Integrins $\alpha 2\beta 1$ nachweisbar, welche zu den späteren Zeitpunkten p.i. nicht weiter ansteigt. In den mit HCMV-AD169 infizierten Zellen ist erst nach 24 h p.i. eine deutliche Erhöhung des Integrins $\alpha 2\beta 1$ (2,75-fach) nachweisbar. Zu späteren Zeitpunkten nimmt die Integrin $\alpha 2\beta 1$ -Expression in Vergleich zu den Mockzellen ab (Abbildung 3.16 A). Das Integrin $\alpha 6\beta 1$ konnte weder in den Mockzellen, noch in den mit HCMV infizierten Zellen detektiert werden (Abbildung 3.16 B). Eine HCMV-Infektion reguliert in den HRP die Expression der Integrine $\alpha \nu\beta 1$ und $\alpha \nu\beta 3$ signifikant herunter (Abbildung 3.16 C, D). Zu den Zeitpunkten 10 min, 30 min und 2 h sind beide Integrine in den infizierten Zellen nicht nachweisbar. Nach 6 h ist nur eine geringe Expression zu detektieren, die allerdings um das 53-fache unter der Expression in den Mockzellen liegt. Nach 72 h ist in mit HCMV-AD169 infizierten HRP eine signifikante Überexpression des Integrins $\alpha \nu\beta 1$ erkennbar.

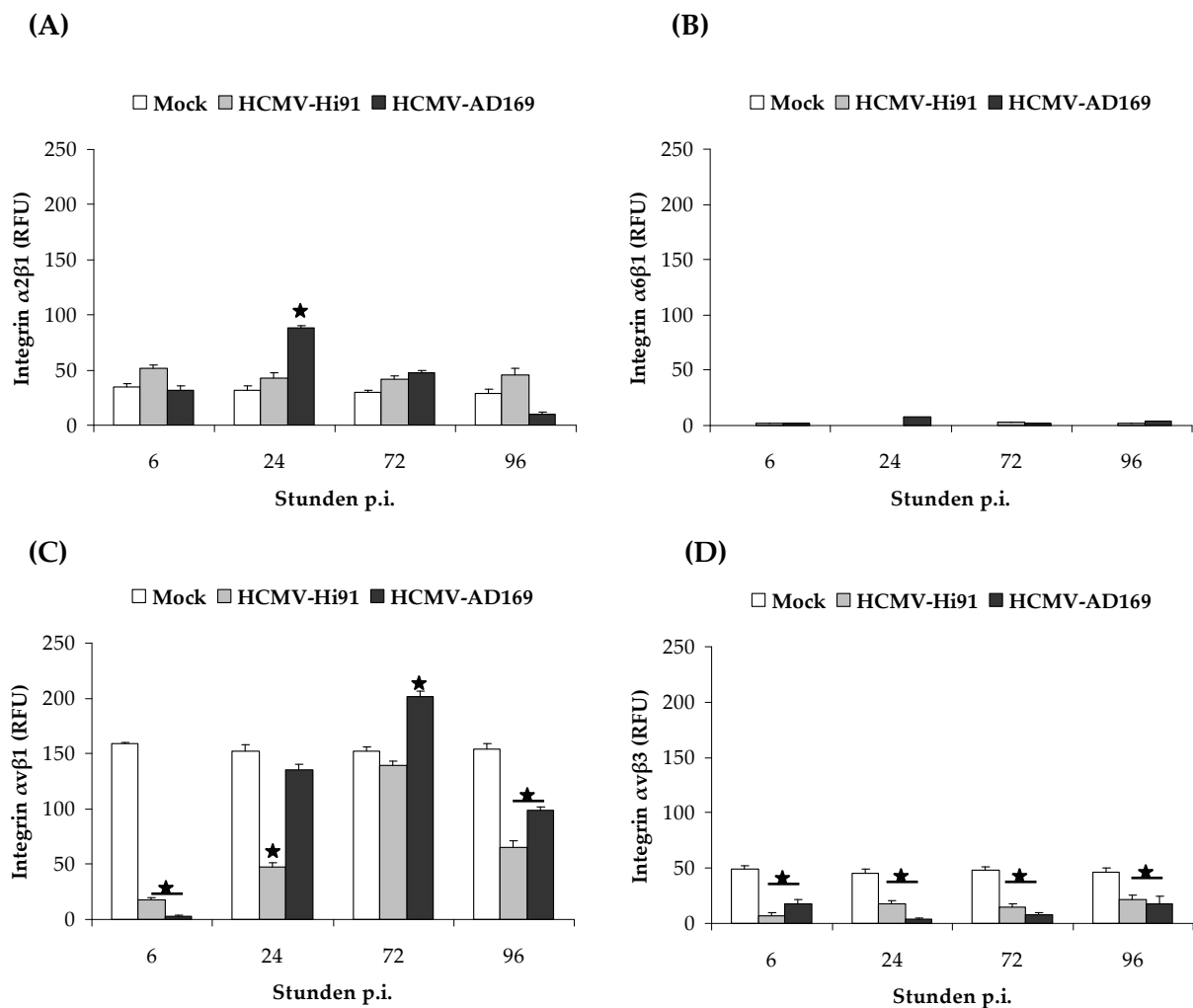


Abbildung 3.16: Analyse der Integrin-Expression mittels Durchflusszytometrie. Die HRP wurden mit HCMV (MOI 2) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit spezifischen Antikörper gefärbt und analysiert. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Mockzellen verwendet. (A) Integrin $\alpha 2\beta 1$ Expression, (B) Integrin $\alpha 6\beta 1$ Expression, (C) Integrin $\alpha v\beta 1$ Expression, (D) Integrin $\alpha v\beta 3$ Expression. Aufgetragen sind die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gegen die Zeit (Stunden p.i.). $n=3$, Mittelwert \pm SA, * $p<0,05$.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Integrine und der EGF-R Rezeptor in infizierten retinalen Perizyten herunterreguliert werden. Eine erhöhte Expression der Integrine $\alpha 2\beta 1$ nach 24 h p.i. und $\alpha v\beta 1$ nach 72 h p.i. ist nur bei einer Infektion mit HCMV-AD169 nachweisbar. Wie erwartet, wurde die ICAM-1-Expression durch die HCMV-Infektion erhöht. Dies könnte eine Erklärung für die entzündlichen Prozesse während einer HCMV-Retinitis in der Retina sein.

3.5 Adhäsionsassay der mit HCMV infizierten Zellen

Die in Abbildung 3.13 und 3.14 dargestellten Ergebnisse zeigen eine Hochregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, welches für die Anhaftung und Infiltration von Leukozyten notwendig ist. Um die damit verbundenen inflammatorischen Prozesse während einer HCMV-Retinitis aufzuzeigen, wurden Adhäsionsassays durchgeführt. Die infizierten und mit $\text{INF-}\gamma$ behandelten Zellen (pos. Kontrolle) wurden nach 72 h mit Jurkat-Zellen inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen vorher mit blockierenden Antikörpern für ICAM-1 und LFA-1 inkubiert, um unspezifische Bindungen der Jurkat-Zellen auszuschließen. Nachdem die Zellen an den Zellrasen gebunden hatten, wurden diese mit dem für Jurkat-Zellen spezifischen CD3 Antikörper gefärbt. Die angehafteten Zellen wurden ausgezählt und die Adhäsion prozentual berechnet. Zur Kontrolle wurden RPE und HFF verwendet.

Bei HCMV-infizierten Perizyten konnte eine 4,6-fach höhere Anhaftung der Jurkat-Zellen im Vergleich zu Mockzellen gefunden werden, welche durch die Blockierung der Adhäsionsmoleküle wieder aufgehoben werden konnte (Abbildung 3.18 A). Es konnte jedoch in RPE keine gesteigerte Anhaftung von Jurkat-Zellen durch HCMV nachgewiesen werden. Eine Infektion der HFF mit HCMV zeigte dagegen keine erhöhte (0,9-fach) Adhäsion von Jurkat-Zellen (Abbildung 3.18 B). Somit konnte gezeigt werden, dass die retinalen Perizyten während einer HCMV-Infektion eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielen, da die ICAM-1 Überexpression in HRP für die Anhaftung der Leukozyten notwendig ist.

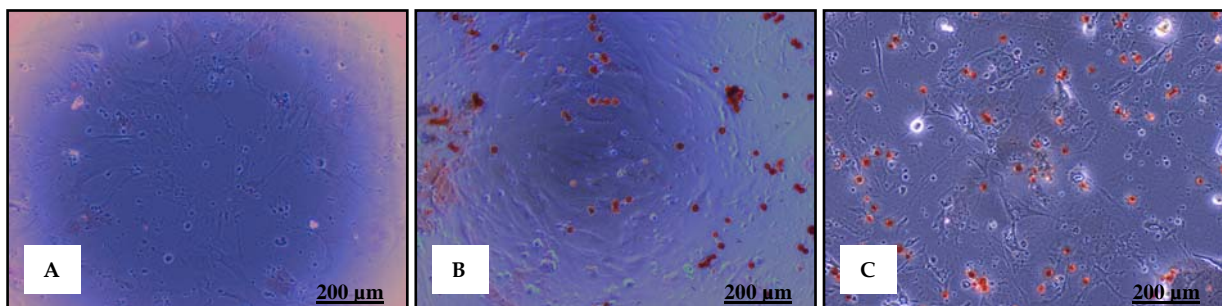


Abbildung 3.17: Adhäsionsassay der HCMV-Hi91 (C) infizierten HRP mit Jurkat-Zellen 72 h p.i.. Als Kontrollen dienten (A) uninfizierte Mockzellen und mit (B) Interferon- γ stimulierte HRP. Nach 1 h Adhäsion wurden die Jurkat-Zellen spezifisch mit dem Primärantikörper CD3/4 und dem biotinylierten Sekundärantikörper gefärbt, ausgezählt und die Adhäsion prozentual berechnet. Die Aufnahmen wurden bei 100-facher mikroskopischer Vergrößerung vorgenommen.

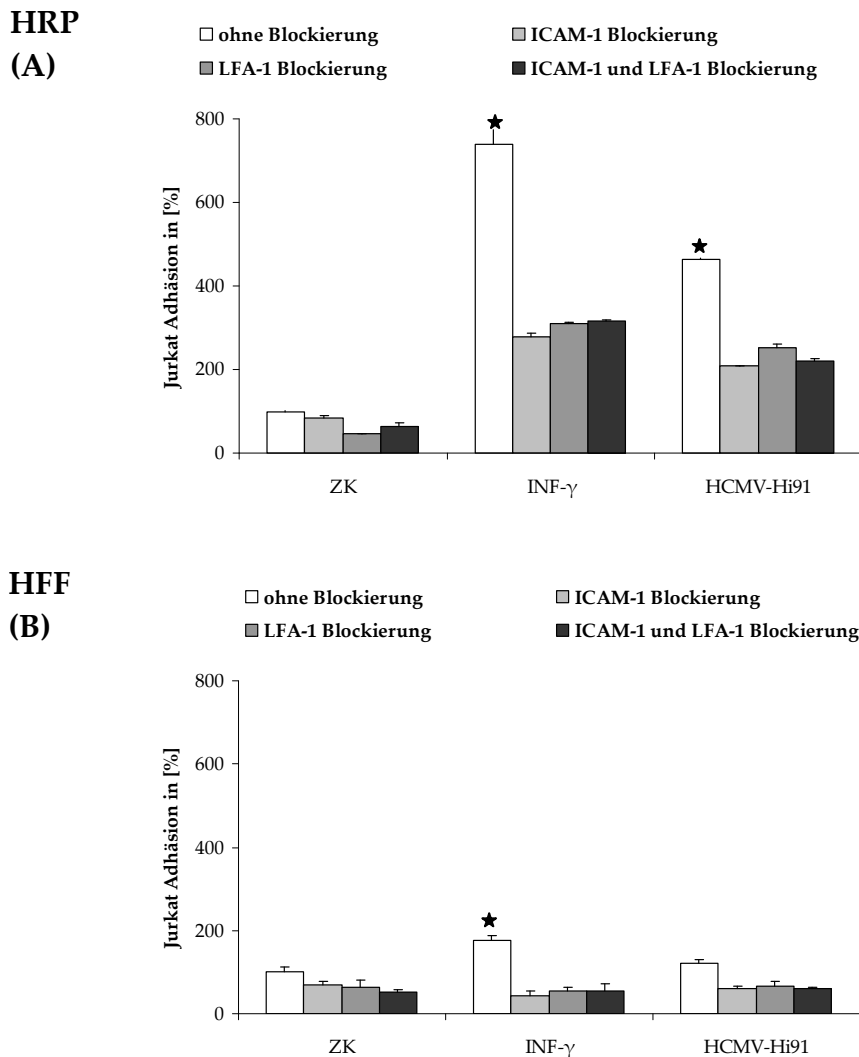


Abbildung 3.18: Adhäsionsassay der HCMV-Hi91 infizierten (A) HRP und (B) HFF mit Jurkat-Zellen 72 h p.i.. Als Kontrollen dienten uninferzierte Mockzellen (ZK) und mit Interferon- γ (INF- γ) stimulierte Zellen. Zur Blockade der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und LFA-1 wurden die Zellen zusätzlich vor Zugabe der Jurkat-Zellen mit blockierenden Antikörpern behandelt. Die gebundenen und mit dem Primärantikörper CD3/4 gefärbten Jurkat-Zellen wurden ausgezählt und die Adhäsion prozentual berechnet. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und gemittelt. $n=3$, Mittelwert \pm SA, $*p<0,05$.

3.6 Expressionsanalyse von Chemokin- und Interleukingenen mittels qRT-PCR und ELISA

Eine HCMV-Infektion kann die Expression zellulärer Gene erhöhen, die für inflammatorische Proteine kodieren. Infizierte retinale Perizyten mit HCMV sind für inflammatorische Prozesse in der Retina mitverantwortlich. Um die Expression spezifischer Chemokine/Interleukine in Perizyten während einer HCMV-Infektion zu untersuchen,

wurden Expressionanalysen mittels qRT-PCR und ELISA-Technologie durchgeführt. Zur Kontrolle wurden RPE und HFF bezüglich der Chemokin-/Interleukinexpression analysiert. Die Zellen wurden mit HCMV infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellkulturüberstände abgenommen und Gesamt-RNA isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Expression der Chemokine und Interleukine mithilfe spezifischer TaqMan *Gene Expression Kits* am 7900HT (Applied Biosystems, Weiterstadt) bestimmt. Die Überstände wurden mittels ELISA (DuoSet ELISA Development Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) auf die Proteinexpression der Chemokine und Interleukine untersucht.

Als Kontrolle wurden Zellen mit UV inaktivierten Virus infiziert, um die spezifische Expression der Chemokine/Interleukine nachzuweisen. Auf transkriptioneller Ebene konnte nach 24 h und 72 h eine Hochregulation der Chemokine CCL2, CCL5, CXCL10 und des Interleukins IL-8 in infizierten Perizyten detektiert werden. Nach 72 h wurde die Transkriptmenge für CXCL10 wieder herunter reguliert. Für IL-6 wurde keine Überexpression in Perizyten gefunden. In HCMV-infizierten RPE wurde eine erhöhte Expression der Gene CCL5, IL-6 und IL-8 detektiert. Nach 72 h wurde in den infizierten RPE eine Hochregulation von CXCL10 nachgewiesen. Für CCL2 wurde keine erhöhte Expression ermittelt (Tabelle 3.5). Die Infektion mit UV inaktivierten Virus zeigte, wie in nicht infizierten Mockzellen, keine Expression der Chemokine und Interleukine.

Tabelle 3.5: Relative Genexpression der Chemokine CCL2, CCL5, CXCL10 und Interleukine IL-8 und IL-6 in HRP und RPE. Dargestellt sind die Expressionen als *fold change* (FC) zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h nach Infektion mit HCMV. n=3, Mittelwert \pm SA, $p < 0,05$.

Gene	Stunden p.i.			
	HRP		RPE	
	24	72	24	72
CCL2	0,78 \pm 0,55	2,16 \pm 0,61	0,32 \pm 0,12	0,7 \pm 0,47
CCL5	99,28 \pm 7,21	171,04 \pm 30,9	1,35 \pm 0,28	0,3 \pm 0,12
CXCL10	158,55 \pm 13,79	3,33 \pm 2,23	2,45 \pm 1,03	99,56 \pm 9,02
IL-8	5,76 \pm 0,35	4,91 \pm 0,59	12,89 \pm 4,58	25,64 \pm 2,59
IL-6	0,42 \pm 0,02	1,7 \pm 0,31	2,23 \pm 0,89	18,59 \pm 2,37

Die Untersuchung der Überstände mittels ELISA bestätigte die qRT-PCR-Ergebnisse. In den Abbildungen 3.19 und 3.20 sind Expressionen der Chemokine und Interleukine in mit HCMV-Hi91 infizierten Perizyten und RPE grafisch dargestellt. In infizierten HRP ist bereits nach 6 h ein signifikanter Anstieg der CCL2 Sekretion nachweisbar, welcher zu späteren

Zeitpunkten (24 h und 72 h p.i.) noch zunimmt (Abbildung 3.19 A1). In RPE ist hingegen keine erhöhte Sekretion von CCL2 nachweisbar (Abbildung 3.19 B1). In HRP konnte eine signifikante Sekretion des Chemokins CCL5 nach 72 h nachgewiesen werden. Dagegen wurde in RPE nur eine geringere Menge an CCL5 detektiert, welche nach 24 h deutlich erhöht war (Abbildung 3.19 A2, B2). Ein weiterer Unterschied zwischen den RPE und HRP zeigte sich in der CXCL10 Sekretion (Abbildung 3.19 A3, B3). In retinalen Perizyten ist nach 6 h und 24 h die höchste Sekretion dieses Chemokins und in RPE nach 72 h nachweisbar. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression der Chemokine CCL5 und CXCL10 in HRP und RPE während einer HCMV-Infektion erhöht ist, dagegen ist die CCL2 Sekretion nur in HRP deutlich gesteigert.

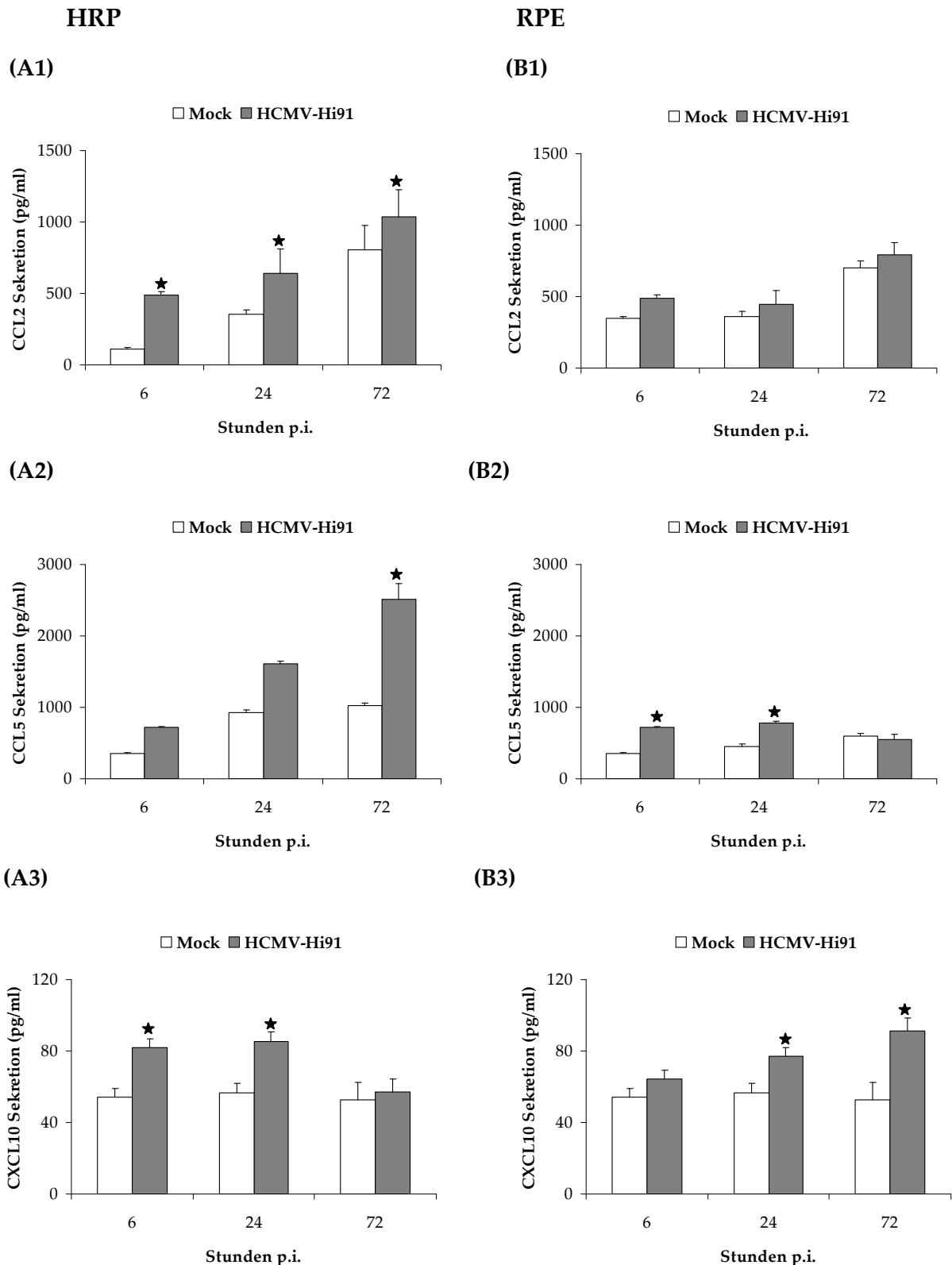


Abbildung 3.19: (A1,B1) Expressionsanalyse der Chemokine CCL2, (A2, B2) CCL5 und (A3, B3) CXCL10 in infizierten HRP und RPE. Die Überstände der mit HCMV-Hi91 infizierten Zellen wurden mittels ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) 6 h, 24 h und 72 h p.i. untersucht. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Mockzellen und mit UV-inaktivierten HCMV-infizierte Zellen mitgeführt. (A1-A3) Chemokinsekretion (pg/ml) in HRP (B1-B3) Chemokinsekretion (pg/ml) in RPE. Aufgetragen sind die jeweiligen Sekretionen in pg/ml gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

In beiden Zelltypen (HRP und RPE) konnte nach 6 h eine deutlich erhöhte Sekretion des Interleukins 8 nachgewiesen werden, die sich nach 24 h - 72 h noch erhöhte (Abbildung 3.20 A1, B1). In RPE war auch eine hohe Sekretion des Interleukins IL-6 nach 72 h HCMV-Infektion detektierbar, wobei keine Sekretion dieses Interleukins in HRP, im Vergleich zu den Mockzellen, gezeigt werden konnte (Abbildung 3.20 A2, B2).

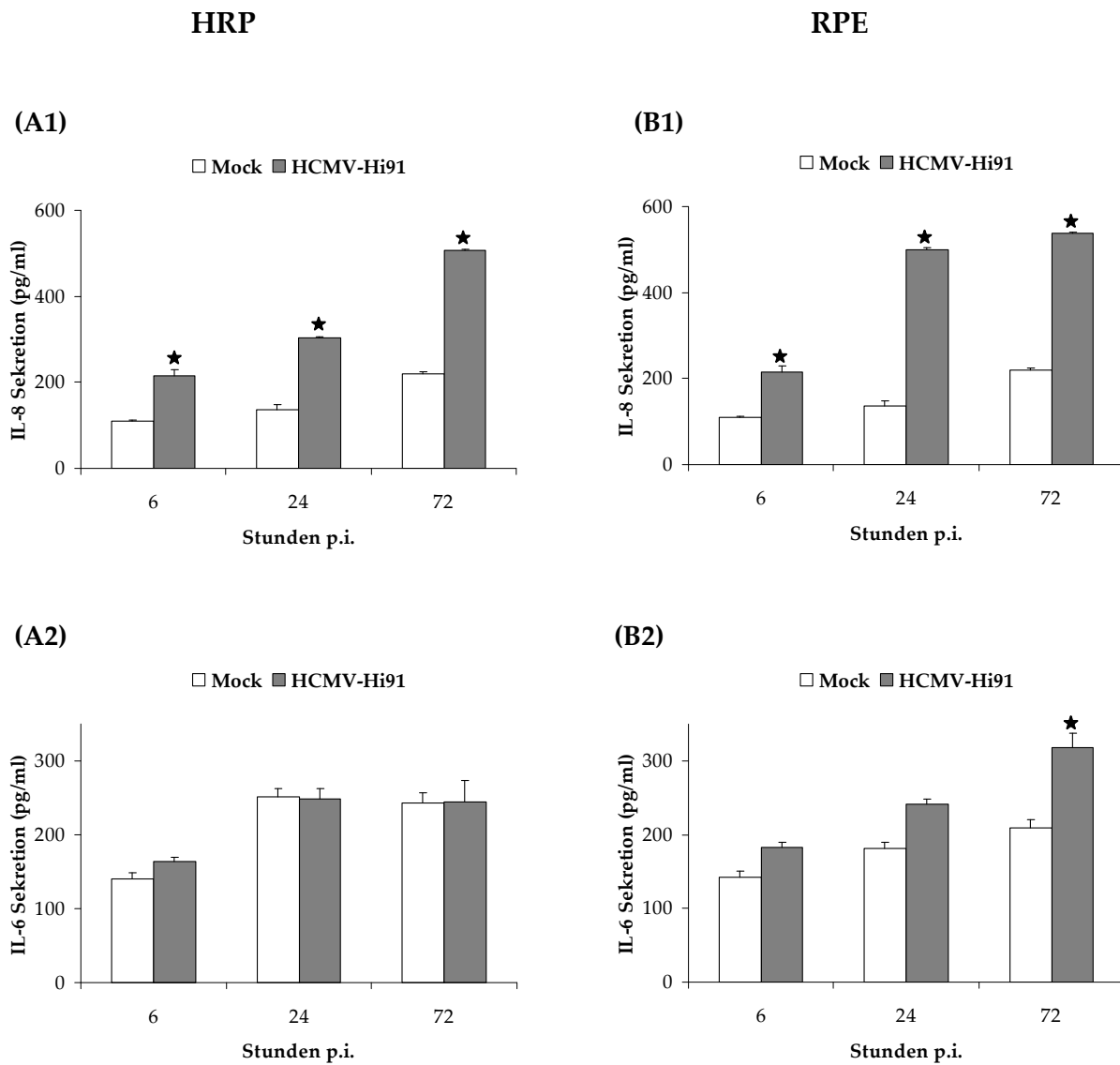


Abbildung 3.20: (A1, B1) Expressionsanalyse der Interleukine IL-8 und (A2, B2) IL-6 in infizierten HRP und RPE. Die Überstände der mit HCMV-Hi91 infizierten Zellen wurden mittels ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) 6 h, 24 h und 72 h p.i. untersucht. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Mockzellen und mit UV-inaktivierten HCMV-infizierte Zellen mitgeführt. (A1, A2) Chemokinsekretion (pg/ml) in HRP, (B1, B2) Chemokinsekretion (pg/ml) in RPE. Aufgetragen sind die Sekretionen in pg/ml gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

3.6.1 Expressionsanalyse der Chemokine und Interleukine nach Überexpression von IE1 und IE2

Zur Überprüfung, ob die gesteigerten Expressionen der Chemokine und Interleukine durch die in der frühen HCMV-Infektionsphase exprimierten viralen Proteine IE1 und IE2 induziert werden, wurden Zellen mit Expressionsplasmiden sowie lentiviralen Vektoren, welche die kodierenden Sequenzen dieser viralen Proteine enthielten, transfiziert bzw. transduziert. Zur Kontrolle dienten die entsprechenden Vektoren ohne inklonierte cDNAs.

3.6.1.1 Expressionsanalysen der Chemokine und Interleukine nach Transduktion mit IE1/IE2-exprimierenden Lentiviren

Zur Überprüfung, ob die Überexpressionen der Chemokine und Interleukine durch die Expression der viralen Proteine IE1 und IE2 induziert werden, wurden die HRP, RPE und HFF mit den lentiviralen Vektoren (LeGO-piG2-BSD-IE1 und LeGO-piG2-BSD-IE2) transduziert. Als Kontrolle diente der Vektor (LeGO-piG2-BSD). Die Transduktionseffizienz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und Immunhistochemie überprüft. In den LeGO-piG2-BSD Vektor ist die für GFP kodierende Sequenz inkloniert. So war es möglich, die GFP-Fluoreszenzen am FACS sowie am Mikroskop zu analysieren. Zur Überprüfung der IE1- und IE2-Expressionen wurden die Zellen spezifisch immunhistochemisch gefärbt. Die RPE und HFF zeigten eine hohe (80%) Transduktionseffizienz. Für die retinalen Perizyten betrug die Effizienz dagegen nur ca. 10% (Abbildung 3.21).

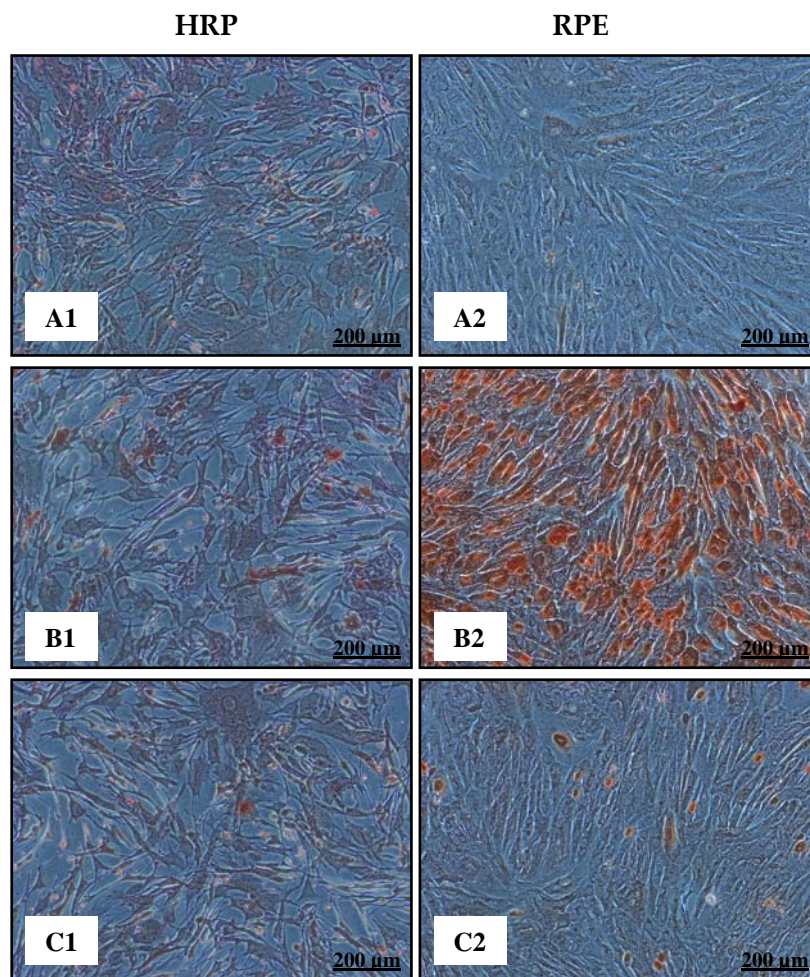


Abbildung 3.21: Spezifische IE1/IE2-Färbung mittels AEC der mit (A1, A2) LeGO-piG2-BSD, (B1, B2) LeGO-piG2-BSD-IE1 und (C1, C2) LeGO-piG2-BSD-IE2 transduzierten HRP (A1-C1) und RPE (A2-C2) nach 72 h. Die Aufnahmen wurden mit einer 100-fachen mikroskopischen Vergrößerung erstellt.

3.6.1.2 Analyse von Transfektionseffizienzen mittels Calciumphosphat- und Lipofectamin²⁰⁰⁰-Transfektion in Perizyten

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz in Perizyten wurde das GFP-Plamid (pmaxGFP®Vector, Lonza Köln) mittels Calciumphosphat sowie Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Die Effizienz wurde anschließend am Fluoreszenzmikroskop und am Durchflusszytometer ermittelt. Für HRP (Abbildung 3.22) und HFF wurde mit Lipofectamin²⁰⁰⁰ die höchste Transfektionsrate (60%) erreicht. Dagegen waren die Effizienzen in RPE beide Transfektionsreagenzien gleich.

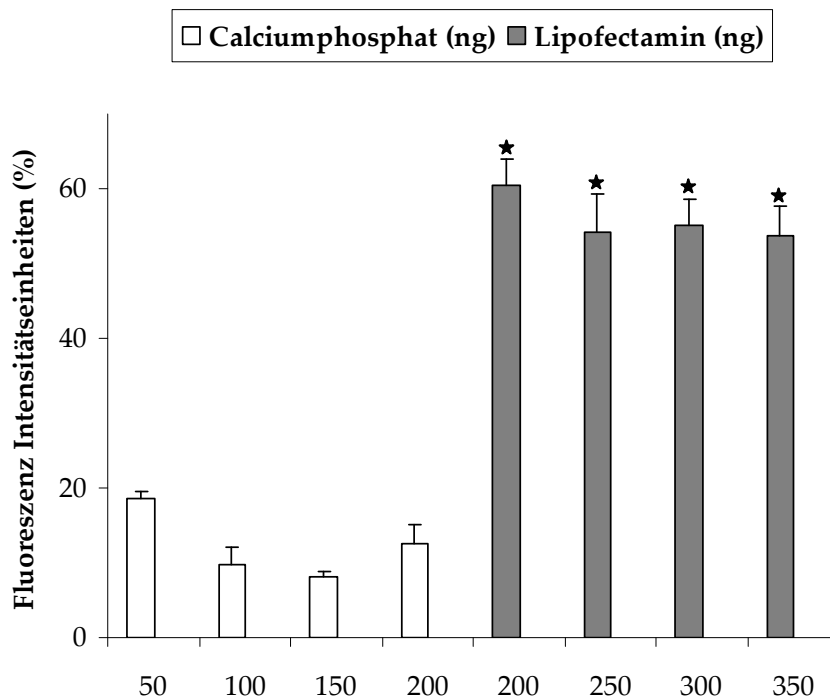


Abbildung 3.22: Analyse der Transfektionseffizienz mit Calciumphosphat und Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in mit pmaxGFP®Vector transfizierten HRP mittels Durchflusszytometrie. Aufgetragen sind die Fluoreszenz Intensitätseinheiten in % gegen das Transfektionsreagenz in ng. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

Der Einfluss der viralen Proteine IE1 und IE2 auf die Chemokin-/Interleukinexpression wurde durch transiente Transfektionen mit Expressionsplasmiden für die viralen Proteine untersucht. Die Zellen wurden wie in 2.2.11.1.2 beschrieben, mit den Plasmiden pCGN, pCGN-IE1 und pCGN-IE2 mit Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Nach 3 h erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 6 h, 24 h und 72 h Inkubation wurden von den transfizierten Zellen Überstände abgenommen und bei -80°C weggefroren. Zusätzlich wurde von den Zellen Gesamt-RNA für die qRT-PCR-Analyse isoliert.

3.6.1.2.1 qRT-PCR-Analyse

Bereits nach einer 6-stündigen Transfektion (Tabelle 3.6) mit pCGN-IE1 konnte ein signifikanter Anstieg der CCL2, CXCL10, IL-8 und ICAM-1 Expression in HRP nachgewiesen werden (p<0,05). Die Transfektion mit pCGN-IE2 zeigte eine erhöhte

Expression von CCL5, CXCL10 und IL-8, die von beiden Plasmiden (pCGN-IE1/2) die Expression von CCL5, CXCL10 und ICAM-1.

Tabelle 3.6: Relative Genexpression der Chemokine CCL2, CCL5, CXCL10, Interleukine IL-8 und IL-6 und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in HRP nach Transfektion. Dargestellt sind die Expressionen als *fold change* (FC) nach 6 h Transfektion mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2, n=3, Mittelwert \pm SA.

Gen	6 Stunden p.i.			
	pCGN	pCGN-IE1	pCGN-IE2	pCGN-IE1/2
CCL2	1,05 \pm 0,2	8,75 \pm 1,26	0,5 \pm 0,16	1,5 \pm 0,23
CCL5	1,22 \pm 0,34	1,19 \pm 0,62	1493,95 \pm 178,8	3004,41 \pm 206,14
CXCL10	2,01 \pm 0,21	6,75 \pm 1,36	11,47 \pm 2,46	13,06 \pm 2,58
IL-8	1,23 \pm 0,45	3,54 \pm 0,54	3,21 \pm 0,74	14,17 \pm 2,75
IL-6	0,8 \pm 0,15	1,02 \pm 0,47	1,03 \pm 0,2	0,98 \pm 0,65
ICAM-1	0,4 \pm 0,21	5,31 \pm 1,02	1,5 \pm 0,3	5,62 \pm 1,4

Nach 24 h Transfektion (Tabelle 3.7) mit dem pCGN-IE1 Plasmid wurde in HRP eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Expression des Chemokins CXCL10 und des Interleukin-8 nachgewiesen und nach der Transfektion mit pCGN-IE2 von CCL2, CXCL10 und IL-8. Die Transfektion mit beiden Plasmiden (pCGN-IE1/2) steigerte deutlich die Transkriptmenge von CCL2, CCL5 und CXCL10.

Tabelle 3.7: Relative Genexpression der Chemokine CCL2, CCL5, CXCL10, Interleukine IL-8 und IL-6 und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in HRP nach Transfektion. Dargestellt sind die Expressionen als *fold change* (FC) nach 24 h Transfektion mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2, n=3, Mittelwert \pm SA.

Gen	24 Stunden p.i.			
	pCGN	pCGN-IE1	pCGN-IE2	pCGN-IE1/2
CCL2	1,02 \pm 0,2	1,06 \pm 0,4	12,7 \pm 1,29	14,75 \pm 1,2
CCL5	0,8 \pm 0,5	2,3 \pm 0,6	3,3 \pm 0,47	4,12 \pm 0,65
CXCL10	2,79 \pm 0,8	14,67 \pm 1,5	19,09 \pm 3,6	42,58 \pm 1,68
IL-8	2,9 \pm 1,3	17,8 \pm 3,5	72,18 \pm 4,6	113,88 \pm 12,75
IL-6	0,95 \pm 0,23	1,3 \pm 0,4	1,02 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3
ICAM-1	0,2 \pm 0,1	1,05 \pm 0,6	1,1 \pm 0,24	1,85 \pm 0,15

Nach 72 h Transfektion (Tabelle 3.8) mit pCGN-IE1 war weiterhin ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der CXCL10 und IL-8 Genexpression nachweisbar und durch die Transfektion mit pCGN-IE2 die des Chemokins CCL5 und Interleukins 8. Eine deutlich gesteigerte Genexpression durch die Transfektion mit beiden Plasmiden (pCGN-IE1/2) war für IL-8 und ICAM-1 detektierbar.

Tabelle 3.8: Relative Genexpression der Chemokine CCL2, CCL5, CXCL10, Interleukine IL-8 und IL-6 und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in HRP nach Transfektion. Dargestellt sind die Expressionen als *fold change* (FC) nach 72 h Transfektion mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2, n=3, Mittelwert \pm SA.

Gen	72 Stunden p.i.			
	pCGN	pCGN-IE1	pCGN-IE2	pCGN-IE1/2
CCL2	1,6 \pm 0,41	2,5 \pm 0,12	2,8 \pm 0,39	3,1 \pm 0,79
CCL5	3,15 \pm 1,02	6,41 \pm 2,1	8,64 \pm 1,5	6,38 \pm 1,26
CXCL10	2,82 \pm 0,54	4,22 \pm 0,62	2,95 \pm 0,4	2,27 \pm 0,95
IL-8	2,04 \pm 0,32	12,74 \pm 1,58	17,2 \pm 3,7	51,76 \pm 3,84
IL-6	0,4 \pm 0,1	1,06 \pm 0,6	1,05 \pm 0,2	0,9 \pm 0,24
ICAM-1	1,15 \pm 0,35	1,42 \pm 0,51	2,13 \pm 0,35	3,51 \pm 0,6

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen zeigen, dass in HRP das Adhäsionsmolekül ICAM-1 durch IE1 überexprimiert wird. Die CXCL10- und IL-8-Expression wird von IE1, IE2 und die Kombination beider erhöht. Eine gesteigerte Transkriptmenge von CCL5 wird nur durch IE2 und die Kombination IE1/2 nachweisbar.

3.6.1.2.2 ELISA-Analysen

Um die Expressionsanalysen der Chemokine/Interleukine auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden die Zellkulturüberstände der nicht infizierten Mockzellen, der mit HCMV-infizierten und mit UV-inaktivierten HCMV-infizierten Zellen mittels ELISA analysiert.

Die CCL2-Sekretion (Abbildung 3.23) wurde nach Transfektion von pCGN-IE1 in HRP nach 6 h und 72 h signifikant erhöht. Eine gesteigerte Proteinexpression wurde auch nach 24 h und 72 h durch die Transfektion mit pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 in Kombination detektiert. Der Plasmidvektor pCGN zeigte keine Einfluss auf die CCL2-Expression. In den Überständen der RPE wurde kein CCL2 nachgewiesen. In Vorhautfibroblasten wurde nach 72 h in allen Transfektionsansätzen die CCL2 -Produktion gesteigert.

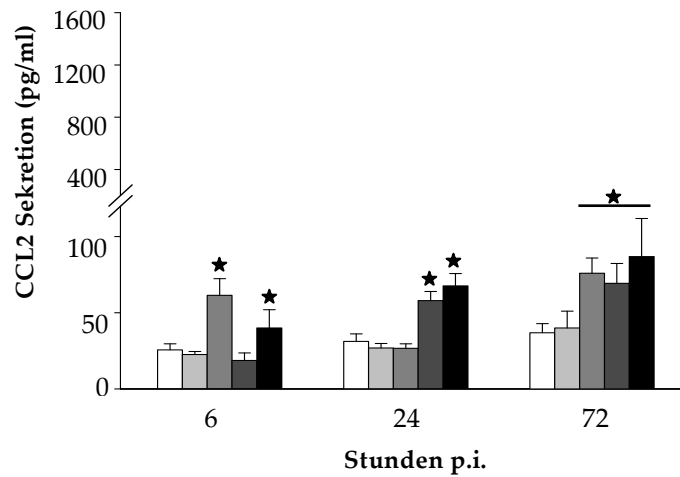
Die Untersuchung der CCL5-Sekretion in HRP ergab eine signifikante Erhöhung nach 6 h Transfektion mit den Plasmiden pCGN-IE2 und die Kombination pCGN-IE1/2. In RPE war nach 6 h Transfektion mit pCGN-IE1 eine stark erhöhte Expression von CCL5 (2000 pg/ml) nachweisbar. Die Erhöhung durch pCGN-IE2 war ebenfalls signifikant ($p < 0,05$), jedoch wurden nur 1300 pg/ml sezerniert. Nach 24 h war in allen Transfektionsansätzen eine Abnahme der Sekretion von CCL5 nachzuweisen, welche über 72 h nach der Transfektion

noch verstärkt wurde. In HFF konnte nur durch die Transfektion mit pCGN-IE2 und die Kombination pCGN-IE1/2 eine deutlich gesteigerte Produktion des Chemokins CCL5 detektiert werden (Abbildung 3.24).

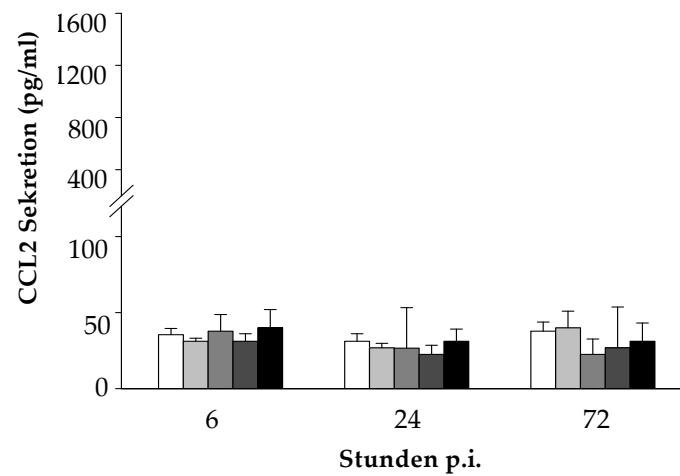
Nach 6 h und 24 h Transfektion mit pCGN-IE2 und beiden Plasmiden für IE1 und IE2 (pCGN-IE1/2) konnte in HRP eine ebenso erhöhte Sekretion von CXCL10 nachgewiesen werden. In RPE war eine gesteigerte Proteinexpression des Chemokins durch die Transfektion mit pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 nach 6 h, 24 h und 72 h detektierbar. Dagegen hatte die Transfektion mit pCGN-IE1 keinen Einfluss. In HFF konnte nach 6 h und 24 h in den Transfektionsansätzen pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 eine deutlich gesteigerte Expression des Chemokins CXCL10 nachgewiesen werden. Letztere blieb über 72 h stabil (Abbildung 3.25).

(A) HRP

□ Mock □ pCGN □ pCGN-IE1 □ pCGN-IE2 ■ pCGN-IE1/2

**(B) RPE**

□ Mock □ pCGN □ pCGN-IE1 □ pCGN-IE2 ■ pCGN-IE1/2

**(C) HFF**

□ Mock □ pCGN □ pCGN-IE1 □ pCGN-IE2 ■ pCGN-IE1/2

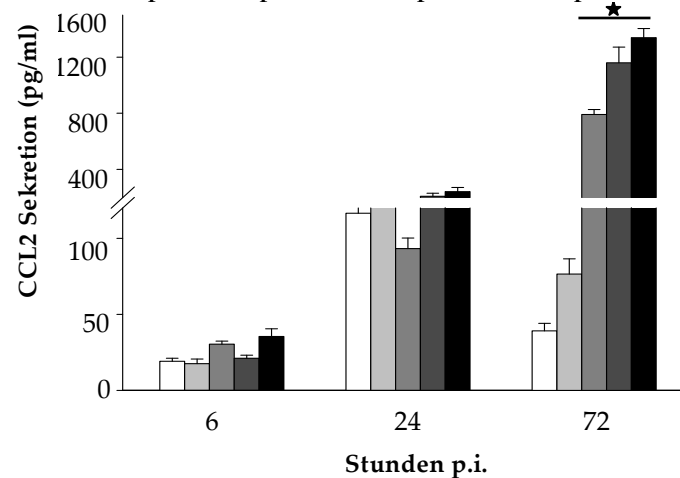


Abbildung 3.23: CCL2-Sekretion (pg/ml) der mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 und transfizierten (A) HRP, (B) RPE und (C) HFF. Die Überstände der transfizierten Zellen wurden mittels ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) 6 h, 24 h und 72 h nach Transfektion untersucht. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Mockzellen mitgeführt. Aufgetragen sind die Sekretionen in pg/ml gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

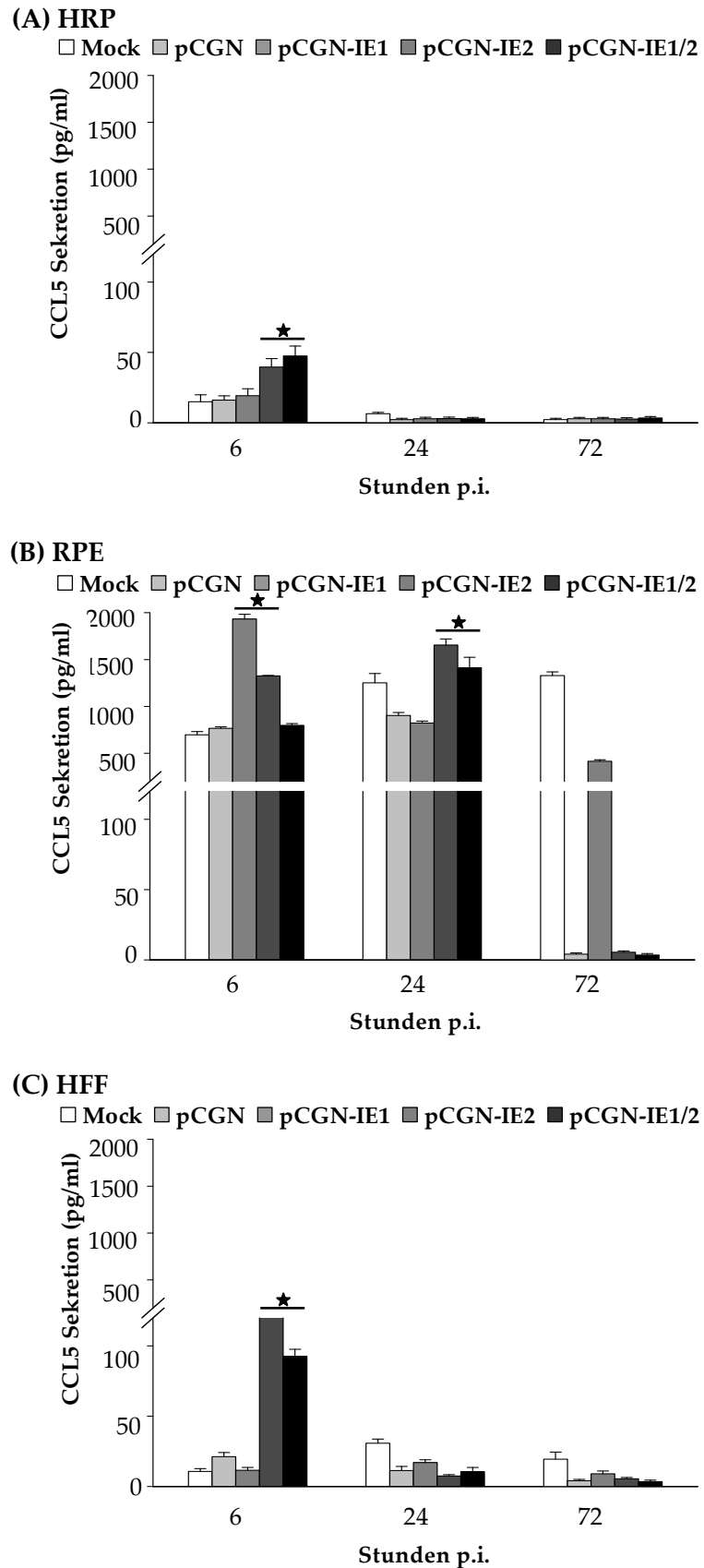
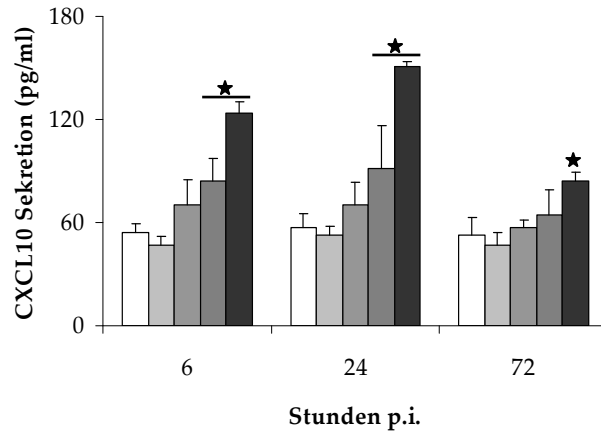


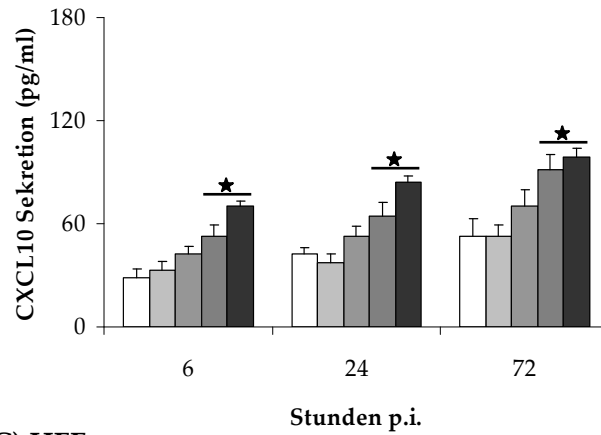
Abbildung 3.24: CCL5 Sekretion (pg/ml) der mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 transfizierten (A) HRP, (B) RPE und (C) HFF. Die Überstände der transfizierten Zellen wurden mittels ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) 6 h, 24 h und 72 h nach Transfektion untersucht. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Mockzellen mitgeführt. Aufgetragen sind die Sekretionen in pg/ml gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

(A) HRP

□ Mock □ pCGN □ pCGN-IE1 □ pCGN-IE2 ■ pCGN-IE1/2

**(B) RPE**

□ Mock □ pCGN □ pCGN-IE1 □ pCGN-IE2 ■ pCGN-IE1/2

**(C) HFF**

□ Mock □ pCGN □ pCGN-IE1 □ pCGN-IE2 ■ pCGN-IE1/2

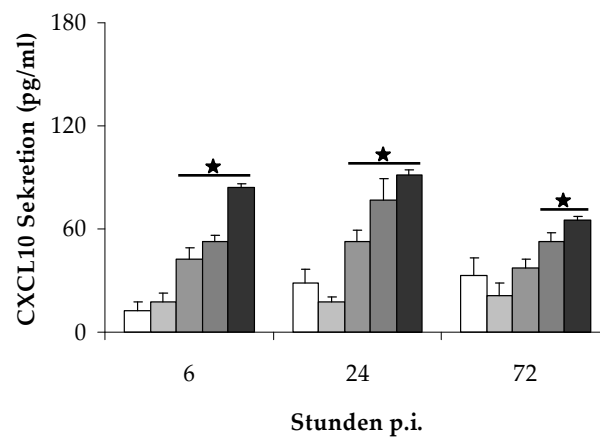


Abbildung 3.25: CXCL10-Sekretion (pg/ml) der mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 transfizierten (A) HRP, (B) RPE und (C) HFF. Die Überstände der transfizierten Zellen wurden mittels ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) 6 h, 24 h und 72 h nach Transfektion untersucht. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Mockzellen mitgeführt. Aufgetragen sind die Sekretionen in pg/ml gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

Die IL-8 Sekretion in HRP wurde nur durch die Kombinationstransfektion mit pCGN-IE1 und IE2 zu allen drei Zeitpunkten signifikant erhöht ($p < 0,05$). Dagegen konnte in RPE eine gesteigerte Expression von Interleukin 8 durch die Transfektion mit pCGN-IE2 nach 24 h und 72 h und durch die Transfektion mit beiden Plasmiden für IE1 und IE2 zu allen drei Zeitpunkten nachgewiesen werden. In den Vorhautfibroblasten (HFF) konnte keine Erhöhung der IL-8 Proteinexpression nach Transfektion mit den Plasmiden detektiert werden (Abbildung 3.26). Die IL-6 Expression in retinalen Perizyten wurde durch eine Transfektion mit den IE-Plasmiden nicht erhöht. In RPE und HFF waren jedoch nach 6 h, 24 h und 72 h in allen Transfektionsansätzen mit den IE-Expressionsplasmiden signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Proteinmengen von Interleukin-6 nachweisbar (Abbildung 3.27). In allen experimentellen Ansätzen wurden die Überstände der mit dem Kontrollvektor pCGN transfizierten Zellen auf Chemokin- und Interleukin-Sekretion untersucht. Diese zeigten, wie die nicht transfizierten Mockzellen, keine erhöhten Zytokinexpressionen.

Zusammenfassend zeigten die Koexpressionsversuche der viralen IE-Proteine, dass die Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 in HRP verstärkt exprimiert und sekretiert werden. Eine durch IE1 gesteigerte Ausschüttung ist nur für CCL2 nachweisbar. Das Interleukin 8 wird nur durch die Koexpression (IE1/2) verstärkt sekretiert. Im Vergleich dazu wird in den mit IE transfizierten RPE kein CCL2 sezerniert und CCL5 vorwiegend durch IE1 verstärkt ausgeschüttet. Ein Unterschied ist auch bezüglich der Interleukin-Expression festzustellen. In RPE wird durch die Transfektion mit IE2 und der Kombination von IE1/2 eine Erhöhung des Interleukin 8 hervorgerufen. Dagegen wird die IL-6 Ausschüttung durch die Koexpression mit IE1, IE2 sowie beider Proteine erhöht.

In den Vorhautfibroblasten bewirken die IE-Expressionen eine erhöhte Sekretion von CCL2, CXCL10 und IL-6. CCL5 wurde nur durch IE2 und der Kombination aus IE1/2 vermehrt produziert.

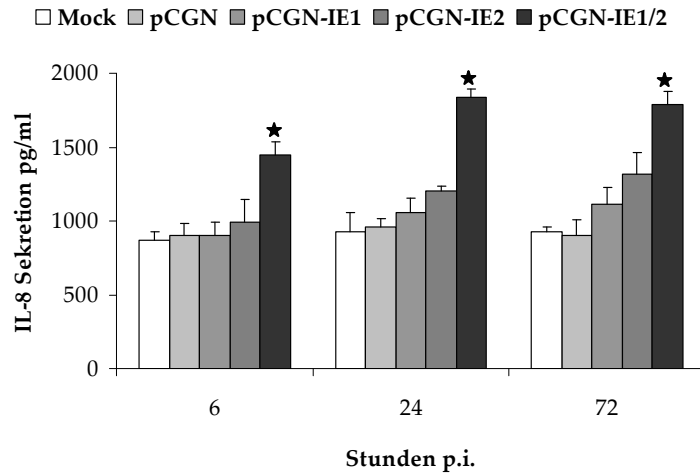
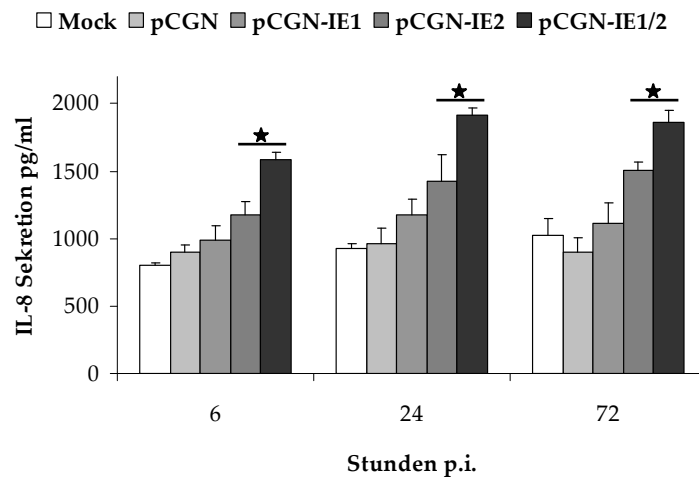
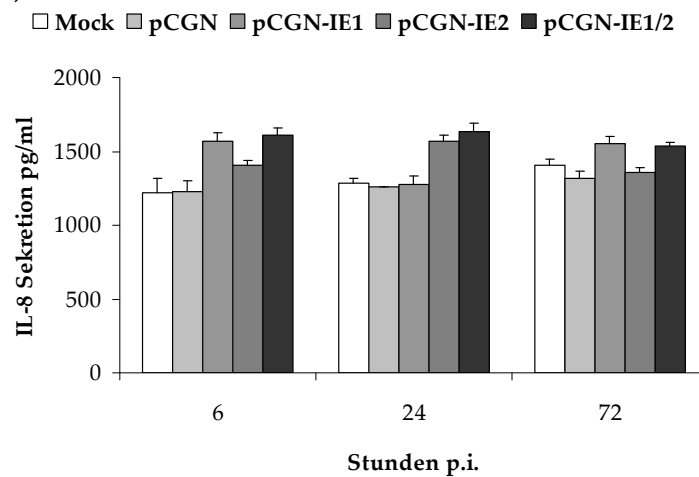
(A) HRP**(B) RPE****(C) HFF**

Abbildung 3.26: IL-8 Sekretion (pg/ml) der mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 transfizierten (A) HRP, (B) RPE und (C) HFF. Die Überstände der transfizierten Zellen wurden mittels ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) 6 h, 24 h und 72 h nach Transfektion untersucht. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Mockzellen mitgeführt. Aufgetragen ist die IL-8-Sekretion in pg/ml gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

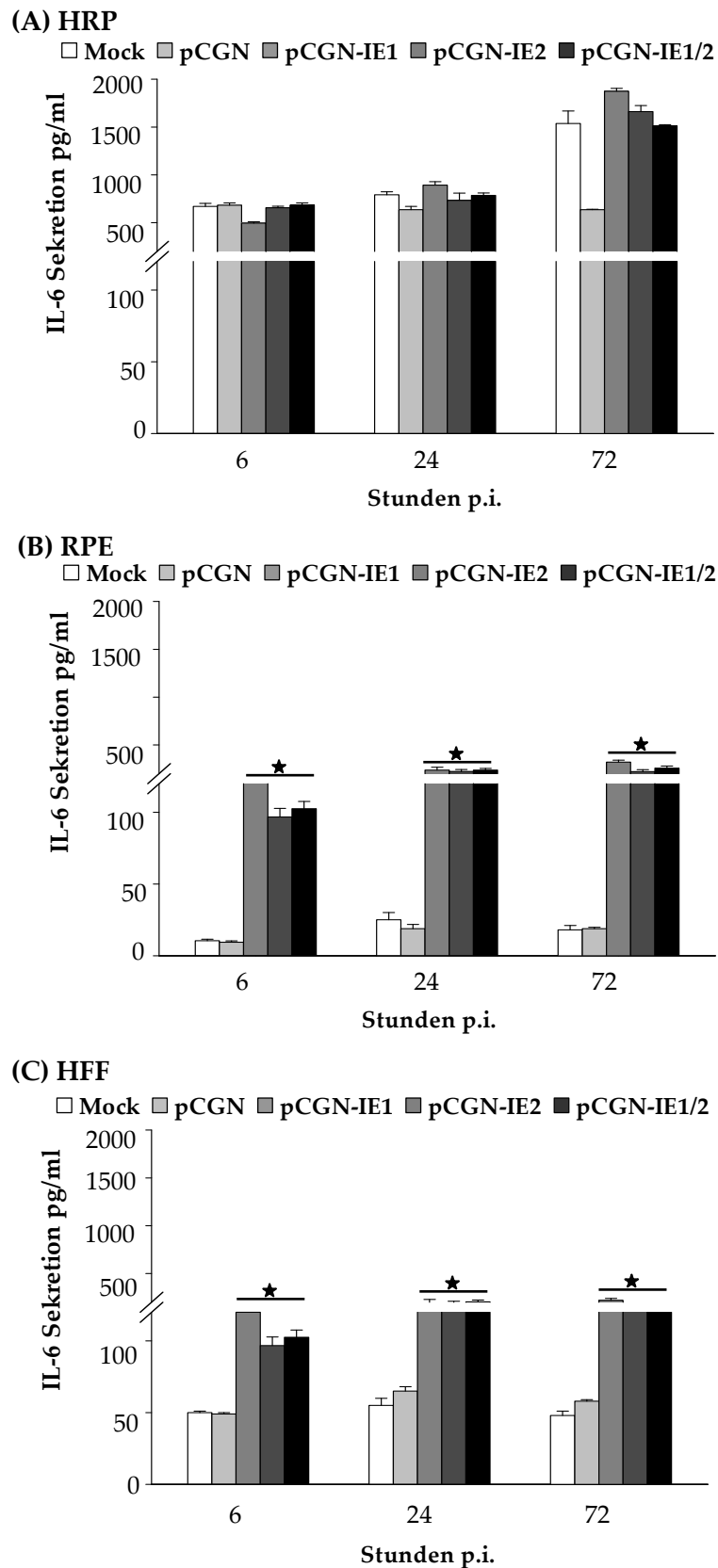


Abbildung 3.27: IL-6 Sekretion (pg/ml) der mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 transfizierten (A) HRP, (B) RPE und (C) HFF. Die Überstände der transfizierten Zellen wurden mittels ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) 6 h, 24 h und 72 h nach Transfektion untersucht. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Mockzellen mitgeführt. Aufgetragen ist die IL-6-Sekretion gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

Neben der Analyse auf Transkript- sowie Proteinebene für die Chemokine und Interleukine, wurden von allen Transkriptionsansätzen mit den IE1/2-Expressionsplasmiden Kernprotein-extrakte hergestellt. Diese wurden mittels ELISA Kit (2.2.11) auf die Aktivierung von NF- κ B p50 und p65 untersucht. Die Transfektion der retinalen Perizyten (Abbildung 3.28 A) und der retinalen Pigmentepithelzellen (Abbildung 3.28 B) mit pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 zeigte keine Aktivierung von NF- κ B p50 und p65. Dagegen konnte in HFF eine Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen werden (Abbildung 3.28 C).

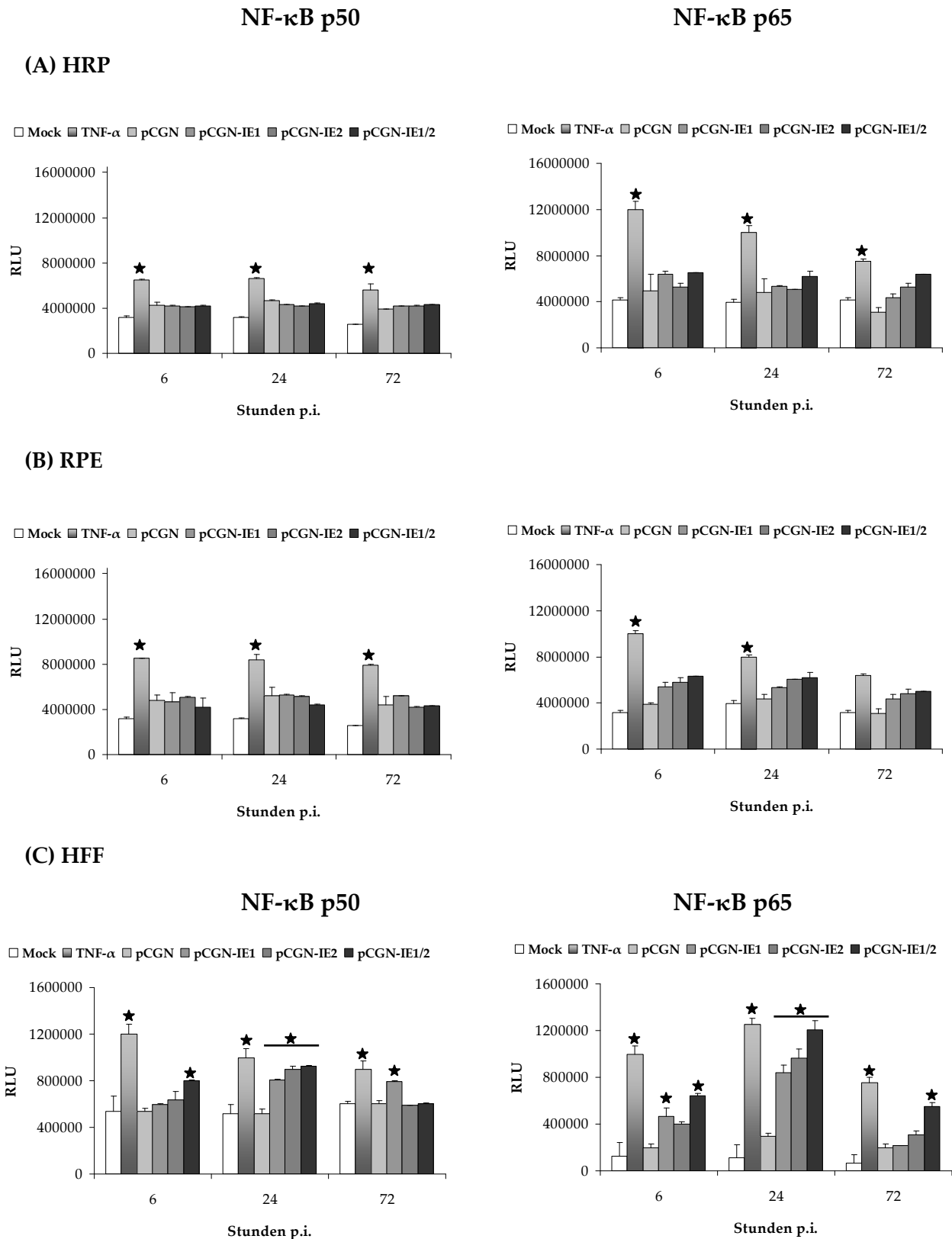


Abbildung 3.28: Aktivierung von NF- κ B p50 und p65 der mit pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 transfizierten (A) HRP, (B) RPE und (C) HFF. Die Kernproteinextrakte der transfizierten Zellen und der Mockzellen wurden mittels *TransAM NF κ B p65 und p50 Chemi Kit* (Active Motif, California, USA) auf die Expression der beiden Untereinheiten untersucht. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Aufgetragen sind die Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) gegen die Zeit (Stunden p.i.). n=3, Mittelwert \pm SA, * p<0,05.

3.7 Luciferase-Reporterassay

3.7.1. Herstellung der Promotorkonstrukte

Durch die Induktion einer Immunantwort, beispielsweise durch ein Pathogen, wie das humane Zytomegalievirus, werden proinflammatorische Signalwege aktiviert, insbesondere die des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Durch ihn werden wichtige Effektormoleküle reguliert, u.a. die Gene der proinflammatorischen Zytokine Interferon-Typ1, TNF- α , IL-6, CCL2 und CCL5. Diese werden sezerniert, binden an spezifischen Rezeptoren verschiedener Zielzellen und aktivieren so proinflammatorische Prozesse. Eine negative Regulation erfolgt durch antiinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-10 und IL-13 (Beutler et al., 2003). Die ELISA-Analysen der infizierten und der mit IE1 und IE2 transfizierten Perizyten haben gezeigt, dass die Zytokine CCL2, CCL5, CXCL10 und das Interleukin 8 durch HCMV verstärkt exprimiert und sekretiert werden. Des Weiteren wurde das für Leukozyten notwendige Adhäsionsmolekül ICAM-1 überexprimiert. Die Promotoraktivitäten dieser fünf Gene wurden mit dem Luciferase-Reporterassay (Promega, Madison, USA) analysiert. Die viralen IE Proteine sind potentielle Transaktivatoren viraler und zellulärer Promotoren. Sie binden entweder direkt an die DNA oder bilden mit Transkriptionsfaktoren bzw. weiterer Kofaktoren Komplexe (Hagemeyer et al., 1992; Lang et al., 1994; Schwartz et al., 1994; Chiou et al., 2006; Hwang et al., 2009).

Ziel war es, den Einfluss auf die Promotoren der Zytokingene durch Koexpression der viralen IE1/IE2-Proteine mittels des Luciferase-Reporterassays in humanen retinalen Perizyten zu untersuchen. Es wurden proximal zum Transkriptionsstart gelegene Promotorkonstrukte (-500 bp) und größere (-3000 bp) distal gelegene Promotorbereiche der Zytokingene generiert. Erstere beinhalten NF- κ B-binding sites und letztere gegebenenfalls potentielle Bindungsstellen anderer Transkriptionsfaktoren. Die mit einer proof-reading Taq-Polymerase generierten PCR-Produkte der verschiedenen Promotorkonstrukte wurden anschließend in den pGL3-Basic Vektor kloniert, der für das Reporterogen *firefly* Luciferase kodiert. Diese erzeugt durch enzymatische Umsatz von Luciferin in Oxiluciferin eine Lichtreaktion, die chemiluminometrisch gemessen werden kann. Zur Normierung und Standardisierung des Assays wurde ein weiterer Vektor mit der *renilla* Luciferase eingesetzt. Dieser Vektor enthält den starken SV40 Promotor, welcher die *renilla* Luciferase exprimiert.

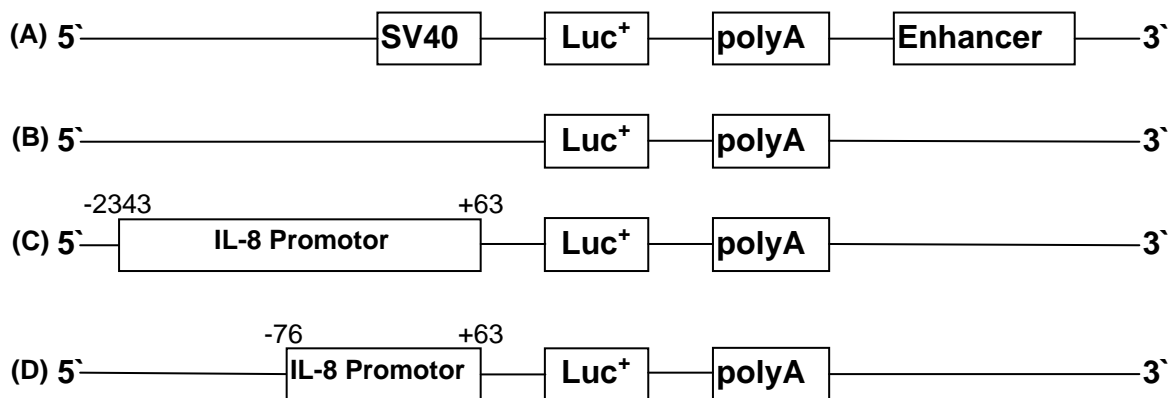


Abbildung 3.29: Schematische Darstellung von pGL3-Control, pGL3-Basic und zwei IL-8 Reporter-genkonstrukten: (A) pGL3-Control-Vektor mit dem SV40-Promotor. (B) pGL3-Basic-Vektor. Reporter-genkonstrukt mit der Promotorregion (-2343/+63) des IL-8 Gens (D) Reporter-genkonstrukt mit der Promotorregion (-76/+63) des IL-8 Gens.

3.7.2 Analyse der Promotoraktivitäten in HRP, HFF und Cos-7-Zellen

Zunächst wurde die Reporter-genaktivität der Promotorkonstrukte in den primären Zellen HRP, HFF und zur Kontrolle in der Zelllinie Cos-7 untersucht. In Abbildung 3.30 sind die Aktivitäten für die CCL2 Promotorfragmente dargestellt. In HRP wurde über den Promotorbereich von (-1355/+55) eine Luciferaseaktivität (298,4 % relative RLU) gemessen. In HFF lag diese bei > 223 % relative RLU. Ferner zeigte das größte Promotorkonstrukt CCL2 (-2522/+55) mit 99,36 % relative RLU auch eine erhöhte Aktivität. In Cos-7 Zellen wurde für den Promotorbereich von (-98 bis +55) eine erhöhte Luciferaseaktivität von 89,85 % relative RFU detektiert. Zusammenfassend ist die Hauptregulation des CCL2-Gen-Promotors in Cos-7 Zellen nur im Bereich zwischen (-98 und +55), dagegen in HRP und HFF zwischen -1355 und +55. In Vorhautfibroblasten wird der Promotor außerdem im Bereich (-2522/+55) reguliert.

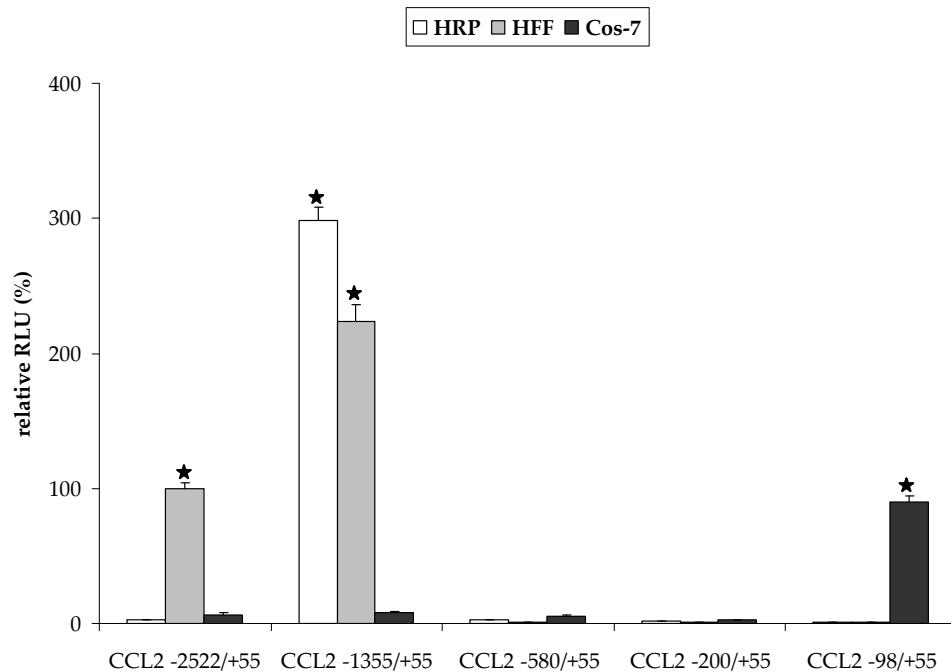


Abbildung 3.30: CCL2 Promotoraktivitäten in HRP, HFF und Cos-7 Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid pRL-SV40 (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Als Kontrolle wurden der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Promotorkonstrukte. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

Die Promotorkonstrukte des CCL5 Gens zeigten in allen drei Zelltypen nur geringe bis fast keine Reportergeraktivitäten. In HFF zeigten die Konstrukte CCL5 (-358/+67) (15,89% relative RLU) und CCL5 (-185/+67) (12,25% relative RLU) die höchste Aktivierung (Abbildung 3.31). Dagegen wurde für die Promotorfragmente des CXCL10 Gens (-2374/+58), (-499/+58) und (-287/+58) in den HFF erhöhte Aktivitäten detektiert. Insbesondere die Konstrukte CXCL10 (-499/+58) (403,02%) und CXCL10 -287/+58 (188,41%) besaßen in HFF eine hohe Reportergeraktivität. In den retinalen Perizyten und den Cos-7 Zellen war keine Aktivität, bzw. nur eine minimale basale Aktivität der CXCL10 Promotorfragmente nachweisbar (Abbildung 3.32). Für die IL-8- und ICAM-1-Promotorkonstrukte wurde in allen drei Zelltypen auch nur eine geringe (ca. 20%) basale Reportergenaktivität gemessen (Abbildung 3.33 und 3.34). Diese minimale Reportergeraktivierung war in den unstimulierten Zellen zu erwarten, da diese auch eine geringe Expression zeigten. Die Promotoren des CCL2- und CXCL10-Gens scheinen jedoch besonders in Vorhautfibroblasten basal aktiviert zu werden.

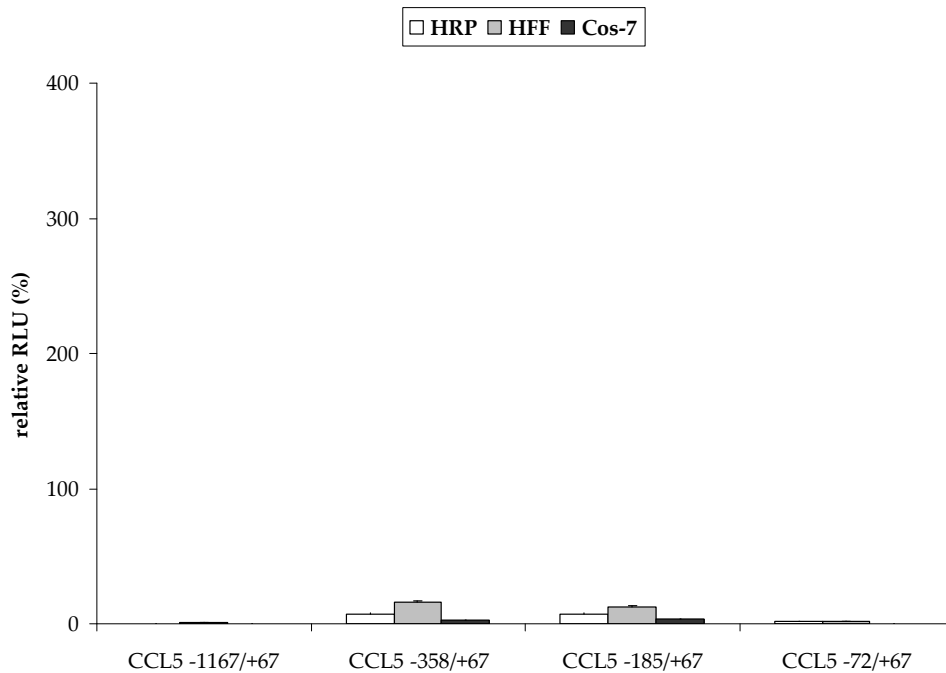


Abbildung 3.31: CCL5 Promoteraktivitäten in HRP, HFF und Cos-7 Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid pRL-SV40 (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Als Kontrolle wurden der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Promotorkonstrukte. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

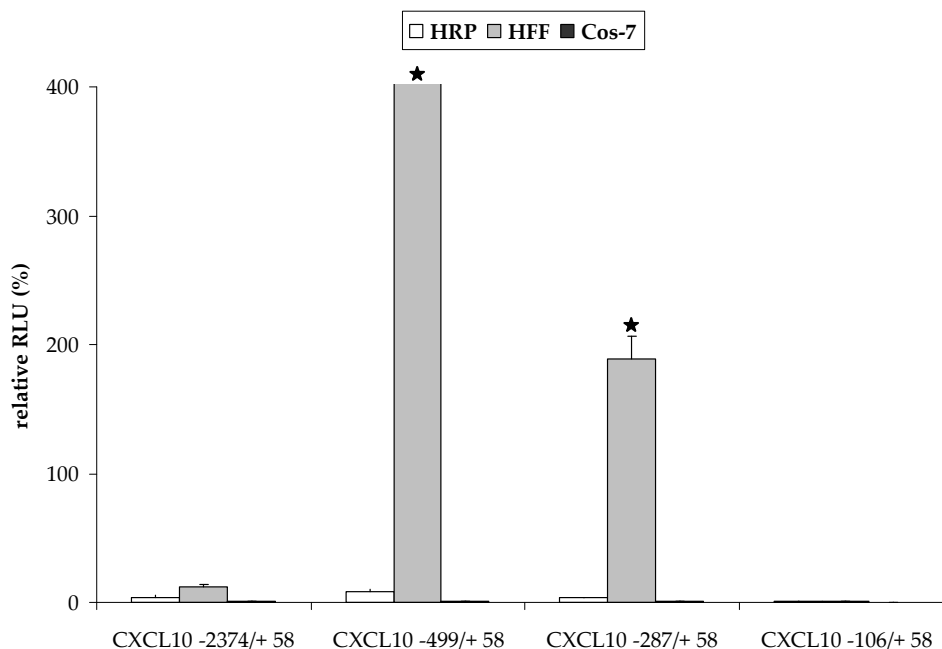


Abbildung 3.32: CXCL10 Promoteraktivitäten in HRP, HFF und Cos-7 Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid pRL-SV40 (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Als Kontrolle wurden der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Promotorkonstrukte. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

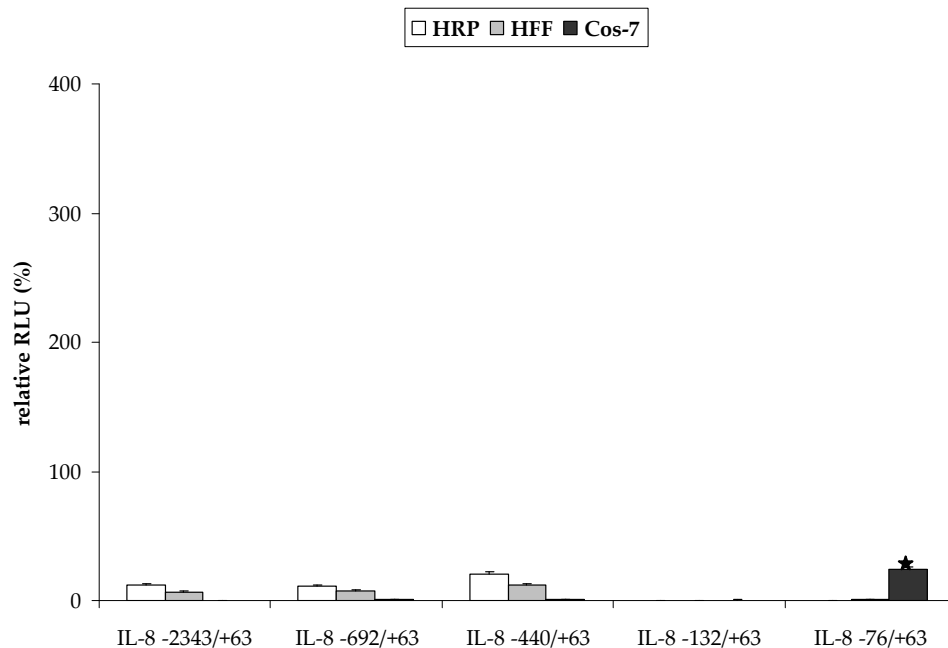


Abbildung 3.33: IL-8 Promoteraktivitäten in HRP, HFF und Cos-7 Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid pRL-SV40 (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Als Kontrolle wurden der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Promotorkonstrukte. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

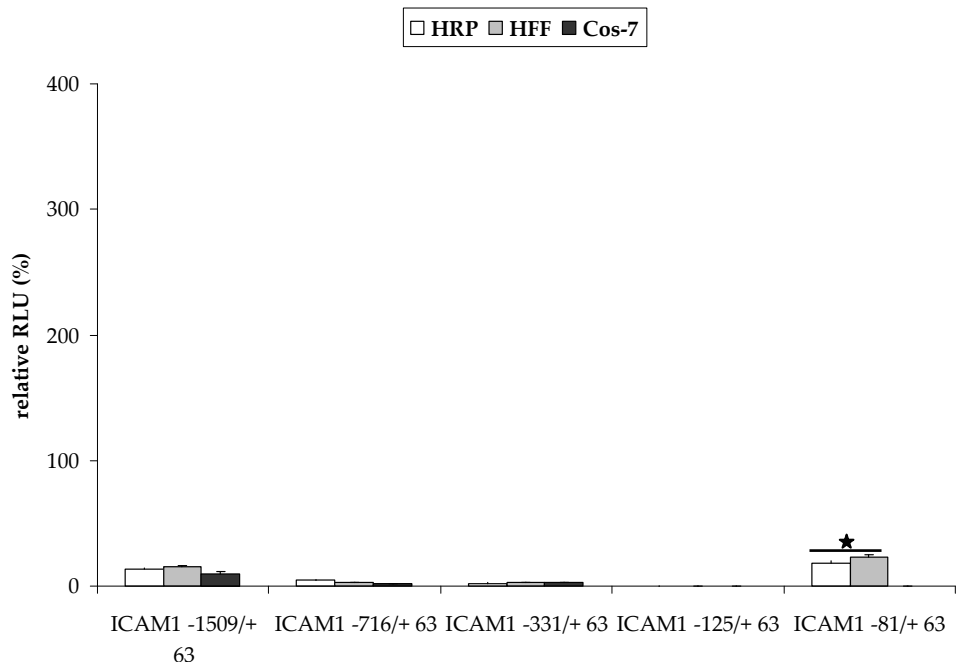


Abbildung 3.34: ICAM-1 Promoteraktivitäten in HRP, HFF und Cos-7 Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid pRL-SV40 (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Als Kontrolle wurden der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Promotorkonstrukte. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

3.7.3 Luciferaseaktivität von Promotorkonstrukten der Chemokin-/Interleukingene und des ICAM-1-Gens nach Kotransfektion mit IE1 und IE2-Expressionsplasmiden

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen zeigten, dass durch eine HCMV-Infektion und die Transfektion der viralen Proteine IE1 und IE2 eine gesteigerte CCL2, CCL5, CXCL10, Interleukin-8 und ICAM-1 Expression in HRP induziert wird. Ziel war, den Einfluss der exprimierten IE1-, IE2-Proteine und beider in Kombination auf die Chemokin-/Interleukin- und ICAM-1-Promotoren mittels der Luciferase-Reportergenanalyse zu untersuchen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit den Reportergenkonstrukten und den Expressionsplasmiden für IE1 und IE2 kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität im Überstand bestimmt. Zur Kontrolle wurden die Expressionsplasmide für IE1, IE2 und dem Vektor pCGN mit dem pGL3-Basic Vektor und dem Kontrollvektor pGL3-Control kotransfiziert, um den Einfluss von IE1/2 zu überprüfen. In Abbildung 3.36 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt. Durch die Kotransfektion mit den Expressionsplasmiden pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und pCGN-IE1/2 zeigte der pGL3-Basic Vektor in HRP, HFF und Cos-7-Zellen keine erhöhte Luciferaseaktivität. Dagegen wurde wie erwartet durch die Kotransfektion des pGL3-Control Vektors, der als positive Kontrolle diente, mit seinem SV40-Promotor durch die Bindung von IE1/2 eine hohe Luciferaseaktivität gemessen. In allen drei Zelltypen zeigte IE2 die stärkste Luciferaseaktivität, da IE2 in der Lage ist, an dem SV40-Promotor zu binden (Zhang & van Santen, 1995; Dean, 1999; Li et al., 2001).

Um den Einfluss des „Vollvirus“ auf den pGL3-Basic und pGL3-Control Vektor zu überprüfen, wurden zusätzlich HCMV-infizierte Zellen mit beiden Vektoren transfiziert. Der Kontrollvektor zeigte, wie in den kotransfizierten Zellen mit IE1/2, eine hohe Luciferaseaktivität, der pGL3-Basic Vektor dagegen nicht (Abbildung 3.35).

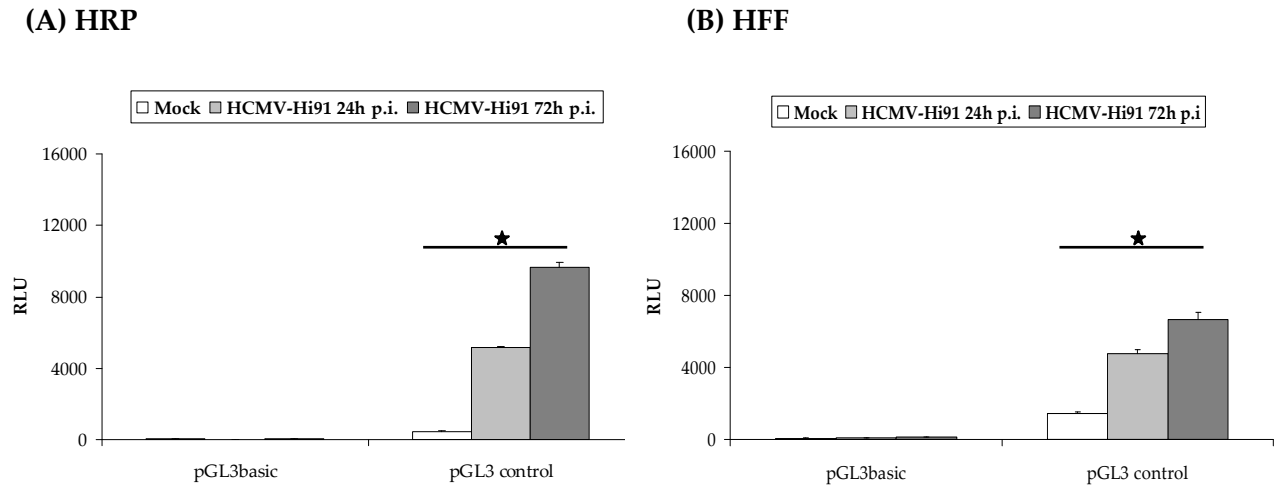


Abbildung 3.35 Einfluss der Infektion mit Vollvirus auf die Kontrollvektoren pGL3-Basic und pGL3-Control in (A) HRP und (B) HFF. Die Zellen wurden 24h und 72h p.i. mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Koexpressionen. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

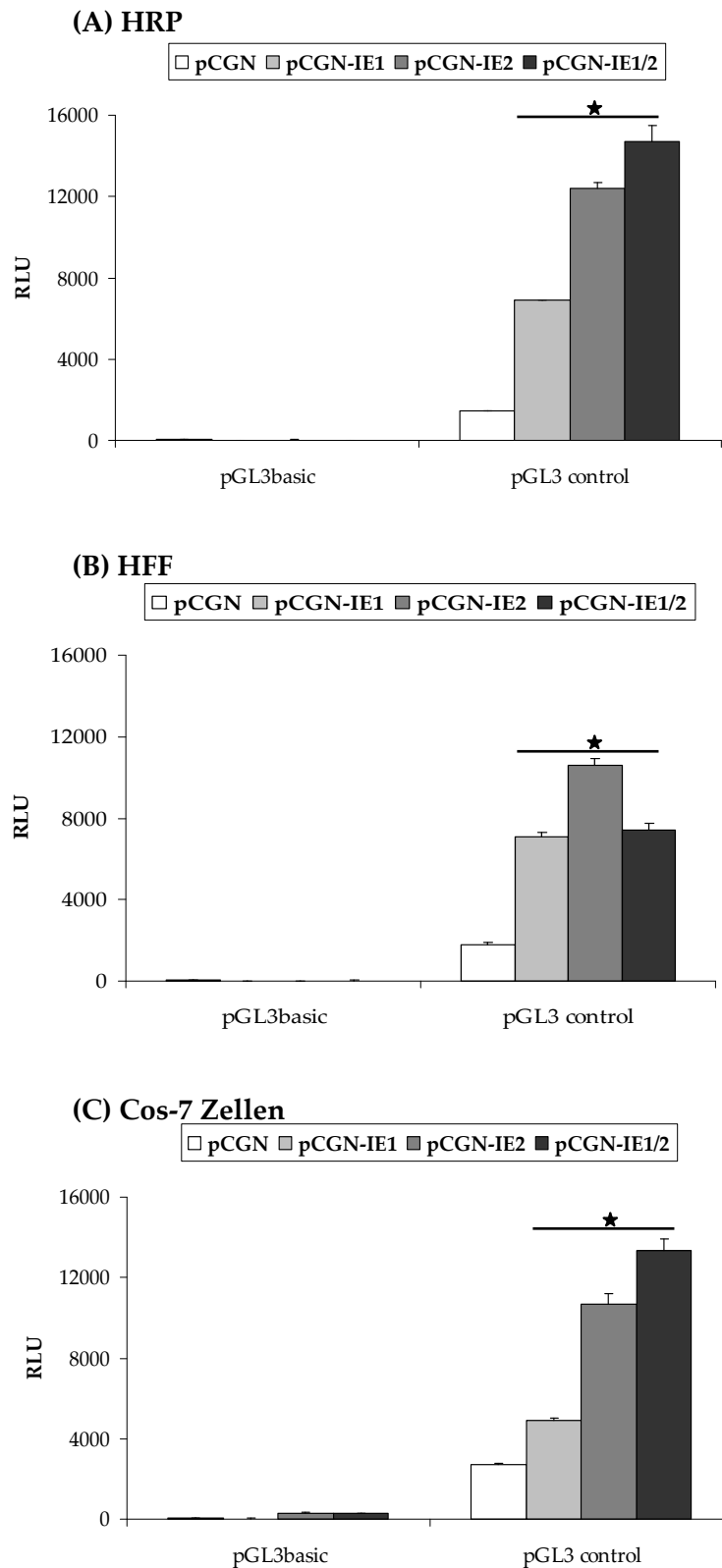


Abbildung 3.36: Einfluss der Expression von IE1/IE2 auf die Kontrollvektoren pGL3-Basic und pGL3-Control in kotransfizierten (A) HRP, (B) HFF und (C) Cos-7-Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 μ g Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurden pro Transfektionsansatz 187,5 ng des jeweiligen Expressionsplasmids transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Koexpressionen. n=3, Mittelwert \pm SA, *p<0,05.

Für den Reporterassay wurden die Promotorkonstrukte des CCL2-, CCL5-, CXCL10-, IL-8- und ICAM-1-Gens mit den Expressionsplasmiden pCGN, pCGN-IE1, pCGN-IE2 und bzw. beider IE-Plasmide kotransfiziert. In allen Transfektionsansätzen wurde zusätzlich der Reporterkontrollvektor pRL-SV40 (*renilla* Luciferase) mit transfiziert, um alle Ansätze zu normieren und miteinander vergleichen zu können.

In Abbildung 3.37 sind CCL2-Promotoraktivitäten durch IE1, IE2 und IE1/2 grafisch dargestellt. Der Promotor des CCL2-Gens wird im Bereich upstream von -98 bp durch die Transfektion mit IE2 und IE1/2 in HRP und Cos7-Zellen aktiviert, in diesem Bereich liegen potentielle Bindungsstellen für NF- κ B und SP-1. In den weiter distal gelegenen Abschnitten < 500 bp wurde die gleiche Aktivität gemessen und ist bei größeren Konstrukten am höchsten. Die Regulation durch IE2 bzw. IE1/2 liegt wahrscheinlich eher im proximalen Bereich des Promotors. In Vorhautfibroblasten wurden für die Promotorkonstrukte CCL2 (-2522/+55) und (-1355/+55) aufgrund der basalen Aktivitäten (Abbildung 3.30) höhere Luciferaseaktivitäten erwartet. Da die erhaltenen Luciferaseaktivitäten niedriger im Vergleich zur Basalen lagen, lässt dies in den Promotorbereichen auf eine reprimierende Regulation durch IE1 und IE2 schließen.

Betrachtet man die Aktivitäten der Reportergenkonstrukte der anderen Zytokingen-Promotoren ist ersichtlich, dass in den proximalen Bereichen um ca. 100 bp vor den Transkriptionsstart, in denen sich keine potentiellen Bindungsstellen für NF- κ B befinden, kein Einfluss durch die viralen IE-Proteine stattfindet. Die Bindungsstellen für eine mögliche Regulation liegen für die Gene CCL5 und IL-8 in den Promotorbereichen -400 bp bis -100 bp (Abbildung 3.38 und 3.40). Die Luciferaseaktivität wurde durch die Kotransfektion von IE2 bzw. IE1/2 deutlich gesteigert. Ein synergistischer Effekt von IE1 und IE2 auf die Promotoren konnte hauptsächlich in den retinalen Perizyten detektiert werden.

Die Reportergenkonstrukte des CXCL10-Promotors zeigen nach der Transfektion mit IE1, IE2 und IE1/2 in HRP, HFF und Cos-7-Zellen nur sehr geringe Aktivitäten (Abbildung 3.39). Somit scheinen die IE-Proteine in HRP und Cos7-Zellen keinen Einfluss auf die CXCL10-Expression zu haben. In den HFF wurden bei den Konstrukten (-499/+58) und (-287/+58) basale Luciferaseaktivitäten zwischen 200 und 400% relative RLU gemessen. In diesen Bereichen scheinen potentielle Bindungsstellen zu liegen, die durch IE1/2 reprimiert werden, da die erhaltenen Luciferaseaktivitäten im Vergleich zur basalen Aktivität niedriger waren.

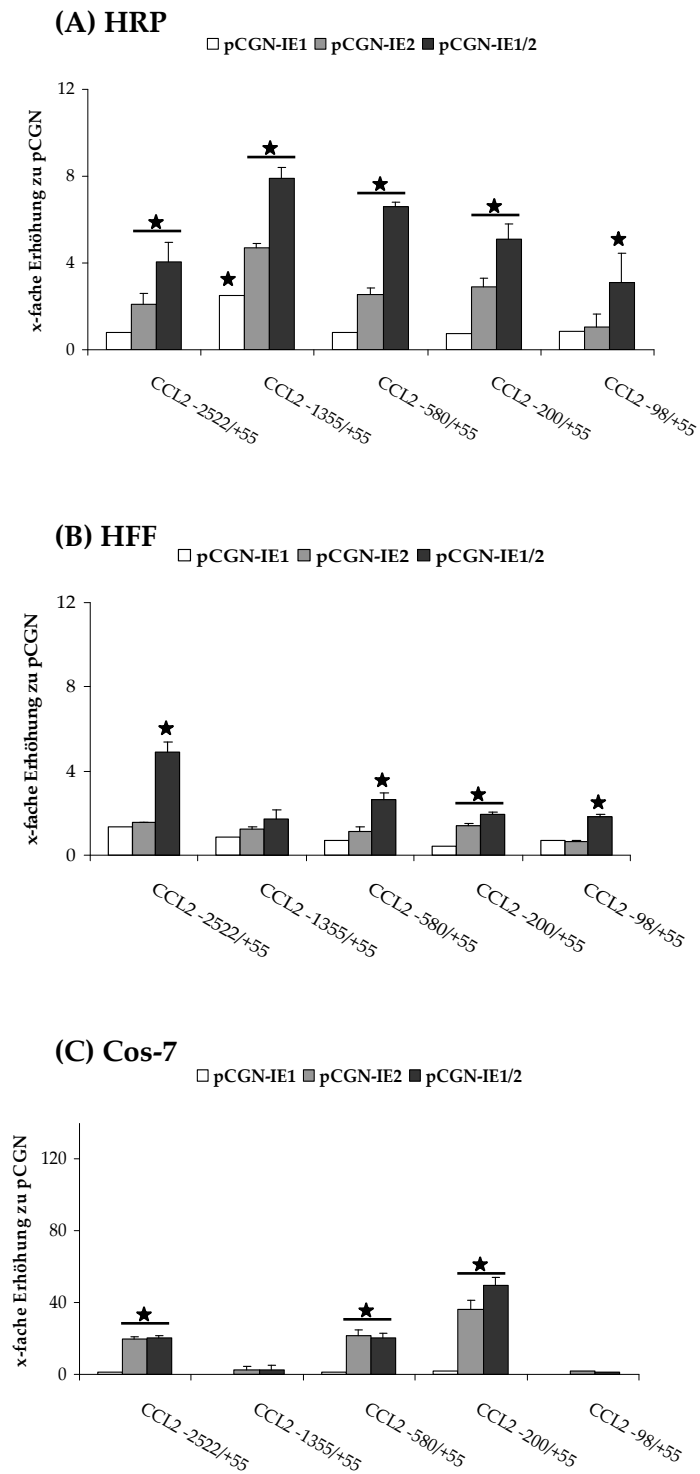


Abbildung 3.37: CCL2 Promotoraktivitäten in (A) HRP, (B) HFF und (C) Cos-7-Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurden pro Transfektionsansatz 187,5 ng des jeweiligen Expressionsplasmids transfiziert. Als Kontrolle wurden der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Koexpressionen mit den Promotorkonstrukten. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

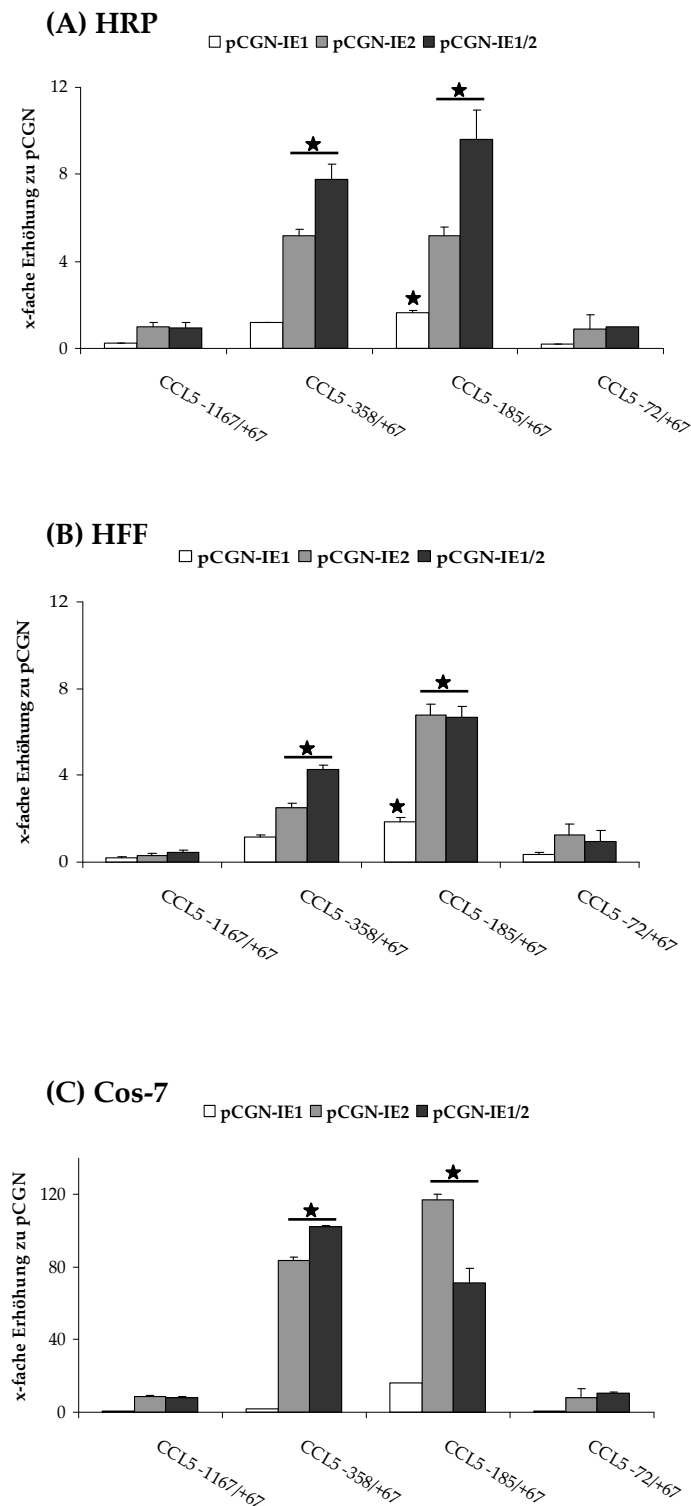


Abbildung 3.38: CCL5 Promoteraktivitäten in (A) HRP, (B) HFF und (C) Cos-7-Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurden pro Transfektionsansatz 187,5 ng des jeweiligen Expressionsplasmids transfiziert. Als Kontrolle wurden der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Koexpressionen mit den Promotorkonstrukten. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

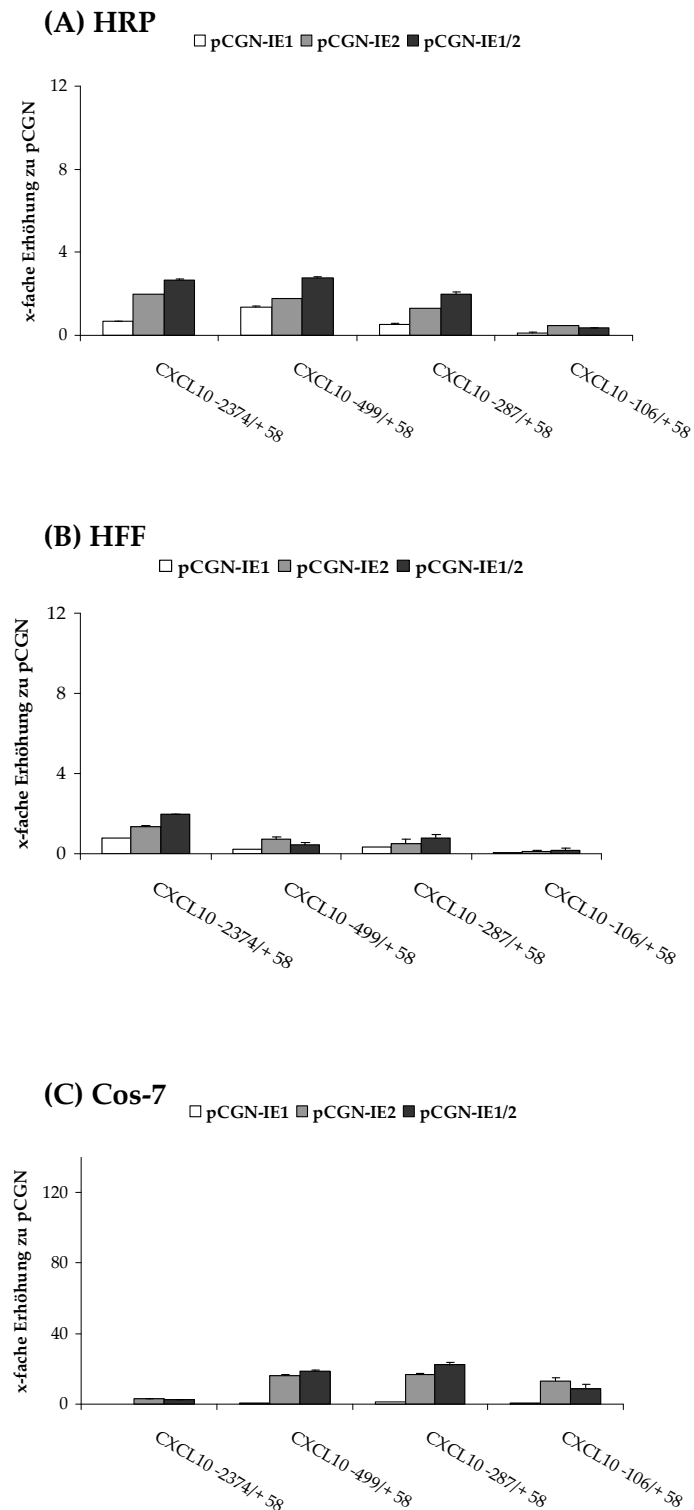


Abbildung 3.39: CXCL10 Promoteraktivitäten in (A) HRP, (B) HFF und (C) Cos-7-Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid pRL-SV40 (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurden pro Transfektionsansatz 187,5 ng des jeweiligen Expressionsplasmids transfiziert. Als Kontrolle der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Koexpressionen mit den Promotorkonstrukten. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

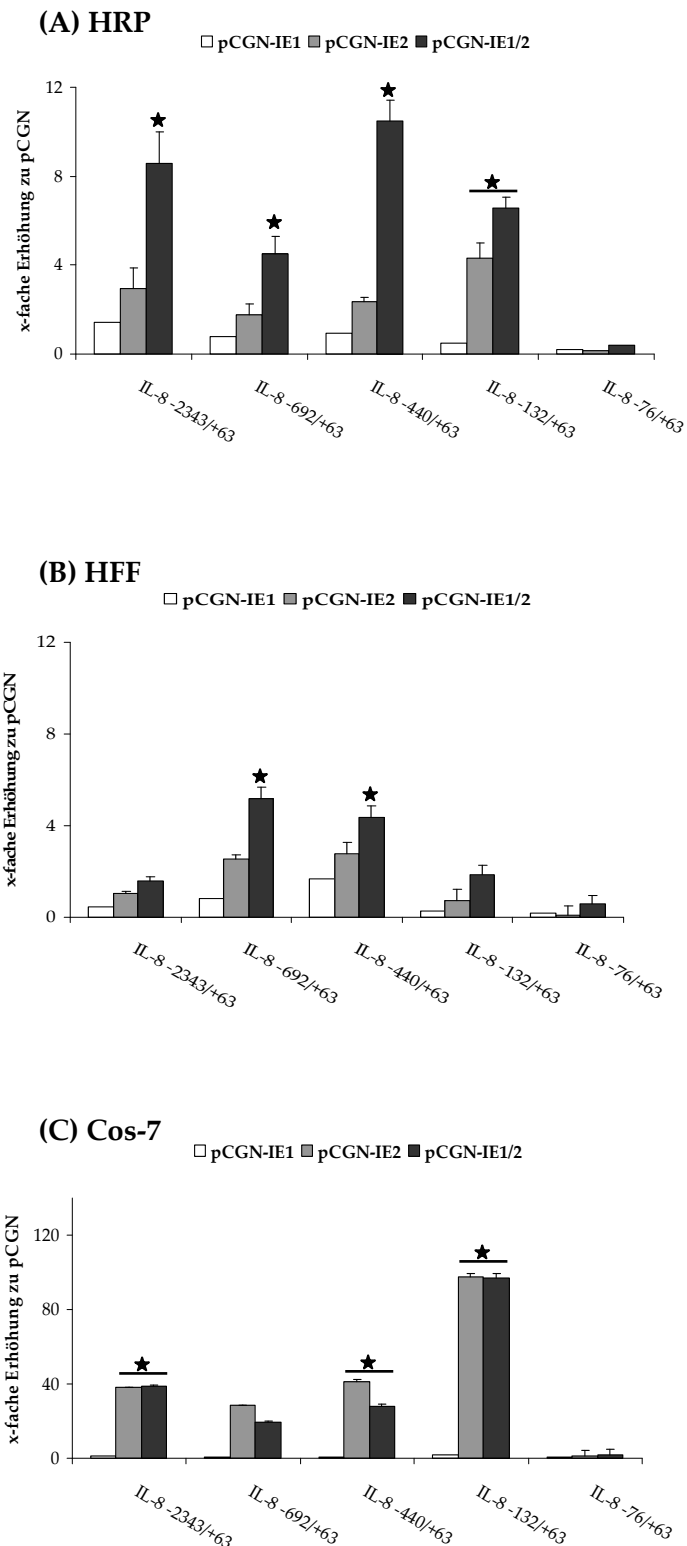


Abbildung 3.40: IL-8 Promoteraktivitäten in (A) HRP, (B) HFF und (C) Cos-7-Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid pRL-SV40 (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurden pro Transfektionsansatz 187,5 ng des jeweiligen Expressionsplasmids transfiziert. Als Kontrolle wurden das der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Koexpressionen mit den Promotorkonstrukten. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05.

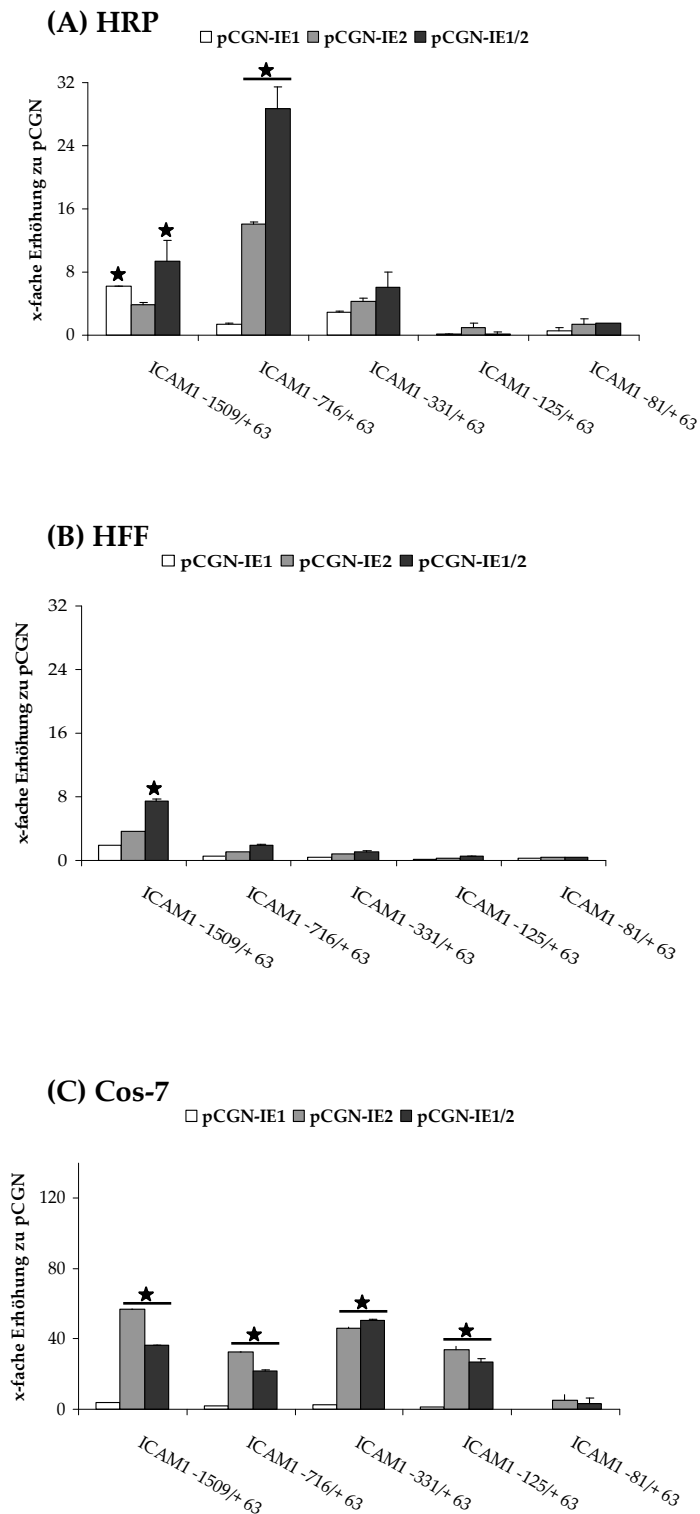


Abbildung 3.41: ICAM-1 Promoteraktivitäten in (A) HRP, (B) HFF und (C) Cos-7-Zellen. Die Zellen wurden mittels Lipofectamin²⁰⁰⁰ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) transfiziert. Es wurden 1,5 µg Reporterplasmid (*firefly*) und 50 ng Reporterkontrollplasmid pRL-SV40 (*renilla*) pro Transfektionsansatz eingesetzt. Zusätzlich wurden pro Transfektionsansatz 187,5 ng des jeweiligen Expressionsplasmids transfiziert. Als Kontrolle wurden der Vektor pGL3-Basic und das Kontrollplasmid pGL3-Control transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität im Überstand chemilumetrisch gemessen. Aufgetragen sind die relativen Lumineszenzeinheiten in % gegen die Koexpressionen mit den Promotorkonstrukten. n=3, Mittelwert ± SA, *p<0,05

Eine mögliche Regulation des ICAM-1 Promotors findet in HRP, HFF und Cos7-Zellen in den Bereichen upstream von 300 bp statt (Abbildung 3.41). In retinalen Perizyten ist im Bereich zwischen -716 bp und +63 bp die höchste Luciferaseaktivität durch Kotransfektion mit IE2 und ein synergistischer Effekt von IE1/2 zu detektieren. In diesem Bereich befinden sich potentielle Bindungsstellen für NF- κ B, AP-1 und SP-1, welche an der Promotorregulation beteiligt sein könnten. Das größte distal gelegene Promotorfragment zeigt als einziges Konstrukt eine deutlich erhöhte Luciferaseaktivität durch die Kotransfektion mit IE1 in HRP.

In Vorhautfibroblasten zeigt nur das größte Reportergenkonstrukt (-1509/+63) eine hohe Luciferaseaktivität. Die weiter proximal zum Transkriptionstart gelegenen Bereiche des Promotors scheinen in HFF nicht durch IE1/2 reguliert zu werden.

In Cos-7 Zellen dagegen, findet eine Regulation des ICAM-1-Promotors im proximalen Abschnitt von -125 bp bis -330 bp statt. Dieser Bereich wird vor allem durch IE2 verstärkt reguliert.

Zusätzlich wurden die Koexpressionsversuche auch mit Vollvirus infizierten Zellen durchgeführt. Es wurden die gleichen Ergebnisse wie in den mit IE1/2 kotransfizierten Zellen erzielt. Dies bestätigt, dass die viralen Proteine IE1, insbesondere IE2, für eine erhöhte Expression der Zytokine und somit auslösend für inflammatorische Prozesse während einer HCMV-Infektion verantwortlich sind. Der Hauptinduktor für inflammatorische Genexpression ist besonders in retinalen Perizyten das IE2-Protein, dessen Einfluss durch IE1 noch gesteigert wird.

4 Diskussion

4.1 HCMV-Retinitis

Die HCMV-Retinitis ist eine der bedeutendsten Infektionen bei immunsupprimierten Patienten. Mittlerweile stellt eine Infektion mit dem Zytomegalievirus eine der Hauptursachen für ein Transplantationsversagen nach dem ersten Jahr aufgrund einer Transplantatvaskulopathie bei Organtransplantaten dar. In diesen Fällen kommt es zu besonders schweren und sogar tödlichen Verläufen. Am häufigsten sind das Auge (HCMV-Retinitis), der Magen-Darm-Trakt und die Lunge betroffen (Koskinen et al., 1993; Kern et al., 2005). Bei einer Reaktivierung von latenten Viren oder einer Primärinfektion mit HCMV kann es zu einer lytischen Vermehrung des Virus kommen. Dabei beeinflusst die produktive HCMV-Infektion die zelluläre Genexpression auf unterschiedliche Weise, um die eigene Vermehrung zu begünstigen und voranzutreiben. In der Retina kommt es so durch pro-inflammatorische Prozesse zu Entzündungen, welche mit einem starken Sehverlust verbunden sind und bis zur Erblindung führen können.

Es ist schwierig, die Latenz von HCMV in Menschen zu untersuchen. Als allgemeines Zellkulturmodell zur Untersuchung der HCMV-Replikation und Latenz, werden Fibroblasten verwendet, welche *in vitro* gut, aber *in vivo* meist sehr schlecht bis überhaupt nicht infiziert werden. Daher werden für die Untersuchung der *in vivo* Prozesse geeignetere Zellmodelle benötigt (Detrick et al., 1996). Bisher werden RPE (retinale Pigmentepithelzellen) *in vivo* als spezifisches Zellmodell für eine Retinitis verwendet. Weitere an einer HCMV-Retinitis beteiligte Zelltypen könnten zur Klärung der Mechanismen bei einer HCMV-Infektion sowie –Replikation in der Retina beitragen. Es gibt einige Unterschiede zwischen den beiden erwähnten Zellmodellen. Im Gegensatz zu den leicht infizierbaren Fibroblasten, in denen die Expression der viralen Proteine sehr hoch ist, repliziert HCMV in RPE atypisch. Ferner ist der Replikationszyklus in RPE sehr langsam, die Zellen produzieren infektiöse Viren, ohne einen CPE (zytopathischen Effekt) zu zeigen, und die viralen IE Proteine werden nur in geringen Umfang exprimiert (Detrick, 1996; Adair, 2006; Detrick & Hooks, 2010). Diese Eigenschaften könnten in Bezug auf die virale Persistenz und die Aktivierung in der Retina eine wichtige Rolle spielen. Bisher ist noch unklar, ob retinale Perizyten, welche zur inneren BRS gehören, bei einer HCMV-Retinitis involviert sind. Die Untersuchung der Perizyten bezüglich einer HCMV-Infektion, der IE-Expression, des Replikationszykluses und immunprivilegierter Eigenschaften, könnten Aufschluss über

mögliche und neue Behandlungsstrategien für eine HCMV-Retinitis geben. Dabei waren die Ziele dieser Arbeit, die retinalen Perizyten zu isolieren, kultivieren, auf ihre Infizierbarkeit mit HCMV zu untersuchen und ein mögliches neues Zellkultursystem zur Untersuchung der HCMV-Retinitis zu etablieren.

4.1.1. Humane retinale Perizyten – Zellen der inneren Blut-Retina Schranke und ihre Rolle bei der HCMV-Retinitis

Perizyten sind perivaskuläre Zellen mesenchymaler Herkunft, welche die Endothelien von Kapillaren und postkapillaren Venolen der inneren Blut-Retina Schranke umkleiden. Sie sind, gemeinsam mit den Endothelzellen, von einer Basalmembran umgeben. Perizyten kommen nicht nur an den Retinakapillaren vor, sondern sind auch mit peripheren Mikrogefäßen assoziiert und den Kapillaren der Blut-Hirn Schranke. Aufgrund der Expression von spezifischen kontraktilen Proteinen wird vermutet, dass Perizyten an der Regulation des kapillaren Blutstroms beteiligt sind (Tilton et al., 1979; Bandopadhyay, 2001). Perizyten besitzen eine Vielzahl funktioneller Eigenschaften. Sie exprimieren den *transforming growth factor* β (TGF- β) und inhibieren so die Proliferation von Endothelzellen. TGF- β bindet an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der Endothelienmembran. Die Zellen verharren in der G1-Phase des Zellzykluses, wodurch der Eintritt in die S-Phase verzögert wird (Heimark et al., 1986; Wakui et al., 1997). TGF- β ist ein multifunktionelles Zytokin, das als immunsuppressiver Faktor eine aktive Rolle in RPE spielt (Naginei et al., 2007). TGF- β ist dabei für die okuläre Immunprivilegierung durch Herunterregulation der APC- (Antigen präsentierende Zelle) Funktion und die Inhibierung der T-Zellfunktion verantwortlich. Außerdem ist TGF- β an verschiedenen Fehlfunktionen im Auge, wie der Netzhautablösung, der proliferativen Vitreoretinopathie und der Neovaskularisierung, beteiligt (Detrick & Hooks, 2010).

HRP besitzen γ -Glutamyl-Transpeptidase und Aminopeptidase N, welche für die Funktion der Blut-Hirn Schranke notwendig sind, indem sie bioaktive Peptide abbauen (Williams et al., 1990; Allt & Lawrenson, 2001). Eine weitere wichtige Kontrollfunktion der Perizyten ist die Eliminierung fremder im Gehirn befindlicher Stoffe, wie z.B. Abfallprodukte, durch Phagozytose im Rahmen der Immunabwehr (Cancilla et al., 1972; Rucker et al., 2000; Rezaie & Male, 2002). Ferner spielen Perizyten eine wichtige Rolle bei der Morphogenese von Kapillaren. Die Struktur und Funktionen der inneren Blut-Retina Schranke gleichen der der

Blut-Hirn Schranke (Stewart and Tuor, 1994). Beide besitzen die gleichen Transportsysteme, wie beispielsweise den (D)-Glukosetransporter und das P-Glykoprotein (Hosoya & Masatoshi, 2005).

Auch in der Pathologie der Blut-Retina Schranke (BRS) wird den Perizyten eine immer wichtigere Rolle zugeschrieben. Die BRS hat eine bedeutende Funktion für die homöostatischen Regulation in der Retina. Sie besteht aus äußeren (RPE) und inneren Komponenten (Endothelzellen, Astrozyten, Müller Zellen und Perizyten). In vielen Studien wurde die Schädigung der inneren BRS aufgrund einer diabetischen Retinopathie, dem ischämisch-zentralen retinalen Venenverschluss und der Hypoxie untersucht. So ist die vasoproliferative diabetische Retinopathie durch einen frühen Verlust von Perizyten, dem sogenannten „*pericyte drop-out*“, gekennzeichnet (Hirsch and D`Amore, 1996; Barber et al., 2000). Die Gefäße sind nicht mehr stabil und werden durchlässiger, was zu einem Ödem, Einblutungen und letztendlich zu Gewebeschädigungen führt (Kaur et al., 2008). In der Retina liegt der Anteil an Perizyten bei ca. 40% und stellt somit den höchsten Anteil im Organismus dar. Die retinalen Kapillaren sind von mehr Perizyten umgeben, als die Kapillaren in der zerebralen Rinde (Frank et al., 1990). Das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen beträgt 1:1. Die Perizyten regulieren den vaskulären Druck, stützen die Kapillarwände, sekretieren extrazelluläres Material, wie Fibronectin, und phagozytieren Substanzen, welche durch die Endothelzellen gelangen (Sims, 1991; Shepro & Maorel, 1993). Aufgrund ihrer vielen wichtigen Funktionen und ihres massiven Vorkommens in der Blut-Retina Schranke, war das Ziel dieser Arbeit humane retinale Perizyten zu isolieren und ihre Rolle bei einer HCMV-Infektion zu untersuchen.

4.1.1.1 Isolation humaner retinaler Perizyten (HRP)

Dieser Zelltyp wurde bisher noch nicht auf seine Infizierbarkeit mit dem humanen Zytomegalievirus und die Beteiligung an einer HCMV-Retinitis untersucht. Es ist beschrieben, dass die retinalen Epithelzellen (RPE) der äußeren BRS und die mikrovaskulären Endothelzellen der inneren BRS eine Rolle während der HCMV-Retinitis spielen. HCMV kann die Endothelzellen von retinalen Kapillaren infizieren und über diese anschließend die Gliazellen der neuronalen Retina. Es werden jedoch nur kleinere Areale der Retina infiziert, die nekrotisieren und vernarben. Vermutlich verhindern die retinalen Perizyten eine Ausbreitung der HCMV-Infektion über die gesamte Retina. Zur

Untersuchung der Infizierbarkeit mit HCMV wurde zunächst die schwierige Isolation und Kultivierung von retinalen Perizyten aus humanen Augen etabliert.

Es wurden verschiedene Methoden für primäre retinale Zellkulturen publiziert (Mukhtar et al., 2002; Antonetti & Wolpert, 2003; Haruta et al., 2004). Es existierten jedoch keine Protokolle für die Kultivierung von Primärkulturen für die Zellen der inneren BRS. Dies gilt ebenso für die Isolation und Zellkultur von Perizyten. Derzeit gibt es nur wenige Beschreibungen zur Kultivierung von Perizyten aus humanen Geweben, wie der Retina (Hohman et al., 1989; Knott et al., 1993), dem Gehirn (Verbeek et al., 1994), der Placenta (Ivarsson et al., 1996) und der Dermis (Helmbold et al., 2001). Die meisten etablierten *in vitro* Perizytenmodelle sind bovinen Ursprungs (Herman & D'Amore, 1985; Nayak et al., 1988; Shepro & Morel, 1993; Anderson & Davis, 1996).

Die Isolation der Perizyten war mit zahlreichen Problemen verbunden. Besonders schwierig war es, geeignete Spenderaugen zu erhalten. In den meisten Fällen wurde von den Augen vorher die Hornhaut präpariert, um diese für Transplantationen einzusetzen. Dabei waren die Augen oft 48 bis 72 Stunden (*post mortem*) alt und teilweise zerstört, sodass diese für die Perizytenisolation nicht mehr geeignet waren. Ferner war bei der geringen Anzahl an intakten Spenderaugen sehr selten ein Spender unter 50 Jahre alt. Auch Hohman (1989) versuchte, seine Methodik für die Isolation von bovinen retinalen Perizyten auf humane Perizyten zu übertragen. Dabei beschreibt er die sehr schwierige Präparation der Retina aus humanen Augen. Ein Auswachsen der Perizyten aus den kapillaren Fragmenten war nur möglich, wenn die Retinae der Spenderaugen in den ersten 24 Stunden *post mortem* entnommen wurden und die Spender jünger als 35 Jahre waren. Dabei ist es ihm nicht gelungen, die humanen retinalen Perizyten über 1-2 Passagen zu kultivieren. Für die Isolation und Kultivierung der HRP wurde in dieser Arbeit ein optimiertes Protokoll, welches die Kultivierung über 12-15 Passagen erlaubte, entwickelt. Zur Etablierung wurden zunächst Rinderaugen verwendet. Für die Isolation von primären Perizyten mussten Augen von Spendern unter 50 Jahren verwendet werden. Isolierte Perizyten aus den Retinae älterer Patienten konnten meist nicht passagiert werden.

Zur Isolation und Kultivierung der Perizyten aus anderen Geweben, wie beispielsweise der Haut oder der Placenta, steht meist eine größere Anzahl und frisches Material zur Verfügung. Dennoch war es bisher sehr schwierig, reine Perizytenkulturen zu isolieren und zu kultivieren (Hohman et al., 1989; Helmbold et al., 2001; Maier et al., 2010). So kamen

einige Präparationstechniken zum Einsatz, wie z. B. das Auswachsen der Perizyten aus einem Gewebestück oder der enzymatische Verdau mit einer Kollagenaselösung (0,2%) mit anschließender Zentrifugation über ein 30 µm bis 100 µm großes Zellnetz. Die kultivierten Zellen aus der Haut wurden nach ihrer Morphologie beurteilt und die Zellen ohne „Perizytenmorphologie“ entfernt. Ferner wurden Perizytenkolonien vereinzelt und Klone isoliert. Diese konnten jedoch kaum vermehrt werden bzw. stellten ihr Wachstum bald ein. Somit ist die Isolation und Kultivierung von Perizyten aus allen Geweben sehr schwierig, auch wenn genügend Versuchsmaterial zur Verfügung steht. Das Auge mit seinem komplexen Aufbau erfordert dabei für die Isolation der Retina und der daraus zu gewinnenden Perizyten zusätzlich ein hohes Präparationsgeschick.

In dieser Arbeit ist es gelungen, humane retinale Perizyten zu isolieren und in einer reinen Kultur über 12 Passagen zu kultivieren. Dabei waren die entscheidenden Faktoren: das Alter der Spenderaugen, das Verhältnis und die Konzentration des Dispase/Kollagenase-Gemisch (2,4 U/mg/172 U/mg) zum enzymatischen Aufschluss der retinalen Kapillaren. Die Verwendung anderer Enzyme bzw. eines abweichenden Konzentrationsgemisches von Dispase und Kollagenase führte zu keiner erfolgreichen Isolation von HRP. Ferner war die Zentrifugation des Zelllysates über ein 70 µm bis 100 µm großes Zellnetz und die Aussaat der Perizyten auf mit Fibronectin oder ECM beschichtete Zellkulturgefäße von großer Bedeutung. Ohne die Zentrifugation über das Zellnetz wurden keine reinen Primärkulturen erhalten. Die spezifische Beschichtung der Kulturgefäße war für die Anhaftung und das Wachstum der Zellen essentiell. Einer der Hauptfaktoren zur Kultivierung und dem Passagieren von HRP war die Optimierung des Kultivierungsmedium durch Zugabe von 15 % fetalem Kälberserum, 5% humanen Serum und 0,01% des Wachstumsfaktor bFGF. Ohne deren Zusatz konnten die HRP nicht passagiert werden.

Zur Identifikation und Charakterisierung der Primärkulturen wurden immunhistochemische Färbungen für kontraktile Proteine, welche spezifisch für Perizyten sind, durchgeführt. Retinale Perizyten exprimieren α -smooth muscle Aktin, β -Aktin, non-smooth muscle Myosin und Vimentin (Bandopadhyay et al., 2001; Maier et al, 2010). Diese Proteine wurden in den isolierten HRP-Kulturen nachgewiesen und damit deren Reinheit bestätigt (Tabelle 3.2; Abbildung 3.4).

4.1.1.2 Infizierbarkeit der HRP im Vergleich zu RPE

Die Perizyten wurden mit verschiedenen MOIs (*multiplicity of infection*) zwischen 0,01 und 10 infiziert. Bei einer MOI von 2 waren nach drei Tagen einige große und aufgequollene HRP mit einem deutlichen zytopathischen Effekt nachweisbar (Abbildung 3.5). Nach 8 bis 15 Tagen der Infektion konnten keine weiteren Zellen mit CPE gefunden werden. Es ist bereits von RPE bekannt, dass diese im Gegensatz zu Vorhautfibroblasten bei höheren MOI keine Zytopathologie (6 Tage p.i.) zeigen. Erst nach 10 Tagen Infektion konnten, wie in HRP, vereinzelt Zellen mit einem CPE nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Experimente mit HCMV-infizierten RPE Zellen (Detrick et al., 1996; Cinatl et al., 2000).

4.1.1.3 Nachweis viraler Proteine und infektiöser Viruspartikel in Perizyten

Die infizierten Perizyten zeigten nur zu einem geringen Prozentsatz einen zytopathischen Effekt. Um zu untersuchen, ob HCMV auch in HRP replizieren kann, ohne eine CPE auszulösen, wurde in infizierten Zellen die Expression der viralen IE und *late* Proteine analysiert. In Perizyten kann HCMV replizieren. In etwa 80% der Zellen wurde bereits nach einem Tag das IE Protein und nach drei Tagen in ca. 50% das *late* Protein nachgewiesen (Abbildung 3.6). Dagegen war in RPE Zellen die IE-Expression zeitlich verzögert und in nur etwa 20% der Zellen nach 30 Tagen p.i. nachweisbar. Auch das *late* Protein war in RPE Zellen erst nach 30 Tagen in 30% der Zellen detektierbar. Während die Zytopathologie der RPE mit der Expression der viralen Proteine übereinstimmte (Detrick et al., 1996), war bei den retinalen Perizyten kein Zusammenhang feststellbar. Auch in den HRP, die keinen CPE zeigten, wurden virale Proteine nachgewiesen.

In HFF war bereits nach einem Tag p.i. in 90% der Zellen IE-Protein und nach drei Tagen p.i. in 90% das *late* Protein detektierbar (Abbildung 3.6).

Beide retinalen Zelltypen zeigen im Vergleich zu den infizierten Fibroblasten Unterschiede in der Expression der viralen Proteine. Jedoch sind auch deutliche Differenzen zwischen HRP und RPE nachweisbar. Die geringe Expression der IE-Proteine in RPE wird in Zusammenhang mit der Persistenz von HCMV in der Retina durch die Umgehung des Immunschutzes gebracht. Die Zellen werden nicht lysiert und das Zytomegalievirus kann sich durch Zell-Zell-Übertragung verbreiten (Fish et al., 1995). Die retinalen Perizyten werden während der HCMV-Infektion nicht lysiert, es wird jedoch in der frühen Phase IE-Protein nachgewiesen. Dies könnte mit der Eigenschaft der Zytomegalieviren zusammen-

hängen, welche die Apoptose in Zellen hemmen und die Zelle in den Zellzyklusarrest treiben können (Skaletskaya et al., 2001). In produktiv infizierten Fibroblasten führt HCMV zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Jault et al., 1995; Lu & Shenk, 1996; Dittmer & Mocarski, 1997). Die Stimulation der Nukleotid- und Replikationsfaktorsynthese bei gleichzeitiger Inhibierung der DNA-Synthese scheint eine essentielle Voraussetzung für einen produktiven Replikationszyklus des Virus zu sein. Bei einer Infektion permissiver Fibroblasten, die sich zum Zeitpunkt der Infektion bereits in der S-Phase oder einer späteren Phase des Zellzykluses befinden, kommt es zu einer Verzögerung der viralen Genexpression, sowie der Replikation (Salvant et al., 1998).

Zur weiteren Überprüfung ob infektiöse Viruspartikel produziert werden, wurden in den Perizyten, RPE und HFF die Titer bestimmt und elektronenmikroskopische Aufnahmen von infizierten Perizyten angefertigt. Die Titer der infizierten Perizyten erreichten am Tag 9 p.i. mit $3,5 \times 10^4$ infektiösen Viruspartikel pro ml ihr Maximum, was in etwa dem Titer von RPE am Tag 9 p.i. entspricht (Abbildung 3.8).

Die RPE erreichen jedoch ihren maximalen Titer von ca. 10^6 am Tag 18 bis 20. In HFF wurde bereits am Tag 4 p.i. ein Titer von ca. 10^5 erreicht. Vergleicht man die Ergebnisse, ist es erstaunlich welchen hohen Titer die retinalen Perizyten erreichen, wobei nur in ca. 1% der Zellen ein zytopathischer Effekt nachgewiesen wurde. In der Vorhautfibroblastenkultur zeigten nahezu alle Zellen einen starken CPE. Die Replikation von HCMV ist somit in HRP ebenfalls verzögert. Jedoch nicht so stark wie in RPE Zellen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der infizierten Perizyten bestätigten eine produktive HCMV-Infektion. Es konnten typische Zytomegalieviruspartikel im Zellkern und im Zytoplasma in allen Stadien der Virusreifung, z.B. die im Zellkern lokalisierten HCMV-Nukleokapside, die im Zytoplasma behüllten Viruspartikel und dense bodies, sowie die sich von der Zellmembran abschnürenden reifen Viruspartikel nachgewiesen werden. Es wurde beschrieben, dass die innere Blut-Retina Schranke nach einer Primärinfektion mit HCMV durch die Virusreplikation in Endothelzellen und die Ausbreitung der Infektion in Gliazellen zerstört wird und so die RPE Zellen infiziert werden (Rao et al., 1998). Gliazellen, mikrovaskuläre Endothelzellen und RPE werden als Zielzellen einer HCMV-Retinitis beschrieben (Pecorella et al., 2000). Welche Rolle retinale Perizyten bei einer HCMV-Infektion spielen, ist bisher noch unklar. Da nur bestimmte Bereiche der Retina Nekrosen

aufweisen und die retinalen Gefäße intakt bleiben, besteht die Vermutung, dass die Perizyten eine schützende Funktion ausüben. In infizierten Perizyten konnte *in vitro* nur ein sehr geringer CPE und eine Lyse dieser Zellen festgestellt werden, was die schützenden Eigenschaften dieses Zelltyps bestätigt.

IE-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der HCMV-Zellinteraktion und lösen proinflammatorische Prozesse aus. Um die Rolle von HCMV an inflammatorischen Prozessen genauer zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen für die viralen IE-Proteine, Transkriptionsfaktoren, das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und die Zytokine CCL2, CCL5, CXCL10, IL-6 und IL-8 in infizierten Perizyten durchgeführt.

4.2. Induktion inflammatorischer Prozesse in HRP durch eine HCMV-Infektion

4.2.1 Expression von Transkriptionsfaktoren durch HCMV

Bei einer HCMV-Infektion werden zelluläre Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B, AP-1 und SP-1, aktiviert (Boldogh et al., 1990). Diese Transkriptionsfaktoren gelten als schnell aktivierbare Regulatoren verschiedener biologischer Abwehrprozesse, z.B. im Rahmen der Antwort auf proinflammatorische Stimuli (Barnes et al., 1997). NF- κ B verändert durch seine Bindung an Promotorregionen die Transkription verschiedener Gene wie z.B. für Chemokine/Zytokine, Adhäsionsmoleküle und andere Transkriptionsfaktoren (Pahl, 1999).

In den mit HCMV infizierten Perizyten konnte, wie in RPE-Zellen, keine Aktivierung der NF- κ B Untereinheiten p50 und p65 und deren Translokation in den Zellkern nachgewiesen werden. Dagegen waren beide Untereinheiten in infizierten HFF aktiviert und im Kern lokalisiert. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass nach 30 min in HCMV-infizierten HFF eine Translokation der NF- κ B Untereinheiten in den Zellkern stattfindet, in RPE Zellen dagegen nicht (Cinatl et al., 2001). Es wurde postuliert, dass die HCMV-Replikation in RPE Zellen durch MAPKinasen und nicht durch NF- κ B reguliert wird. Dies könnte eine Erklärung für die inflammatorische Pathologie während der HCMV-Retinitis sein, die durch eine geringe virale Replikation und die wenigen Leukozyteninfiltrate in der immunprivilegierten Retina charakterisiert ist. Die retinalen Perizyten könnten so die schützenden Zellen der inneren BRS sein, wie die RPE für die äußere BRS. In anderen Zelltypen, wie Fibroblasten, HUVEC und Monozyten ist die schnelle Induktion der NF- κ B DNA-Bindungsaktivität durch die Glykoproteine gB und gH für eine HCMV-Infektion kennzeichnend (Sambucetti et al., 1989; Yurchko et al., 1995 & 1997; Caposio et al., 2007). Die

Transaktivierung der NF- κ B-Gene erfolgt durch die Modulation zellulärer Faktoren und /oder durch die Transaktivierungsaktivität der HCMV-IE Genprodukte (Yurochko et al., 1995 & 1997). Die Aktivierung von NF- κ B ist für die virusassoziierte Immunpathologie und die Expression der COX-Gene, welche proinflammatorische Mediatoren sind, wichtig. Da der Unterschied der infizierten Perizyten in Bezug auf die Zytopathologie und der NF- κ B-Aktivierung zu anderen nicht okularen Zelltypen sehr groß ist, ist zu vermuten, dass HCMV weitere spezifische Mechanismen für die Infektion und Vermehrung verwendet. Es wird postuliert, dass in HCMV-infizierten Endothelzellen keine IE-Proteine produziert werden und die Virusreplikation reprimiert wird, wenn der NF- κ B Signalweg inhibiert wird. Ferner wird die Sekretion proinflammatorischer Chemokine, wie IL-8, CXCL10 und CCL5 in HCMV-infizierten Endothelien durch die NF- κ B Inhibierung unterdrückt (Caposio et al., 2007). Dies könnte für die immunprivilegierten Eigenschaften der retinalen Zellen HRP und RPE von Bedeutung sein.

Ferner wurden die Expression der Transkriptionsfaktoren SP-1 und AP-1 in infizierten Perizyten untersucht. Dabei konnte nur eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 festgestellt werden. AP-1 ist ein Heterodimer-Komplex, welches aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Familien besteht. Es konnte gezeigt werden, dass c-Jun und c-Fos, welche die Hauptuntereinheiten von AP-1 sind, während einer HCMV-Infektion fusionieren und an zelluläre Promotoren binden (Hagemeier et al., 1992; Boldogh et al., 1993). AP-1 wird durch IE1 in Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen aktiviert und ist für die Virulenz von HCMV wichtig (Wang & Sonenshein, 2005; Isern et al., 2011). Somit könnte in Perizyten die HCMV-Infektion hauptsächlich über die Aktivierung von AP-1 vermittelt werden, das durch die MAPKinasen oder den PI3K-Signalweg aktiviert werden kann.

4.2.2 Expression des EGF-R und von Integrinen während einer HCMV-Infektion

Immunopathologische Prozesse bei der Inflammation und Infektion werden durch verschiedene Zytokine, Chemokine, Transkriptionsfaktoren und extrazellulärer Proteine, welche von infiltrierenden Leukozyten oder den betroffenen Zellen selbst produziert werden, reguliert (Wakefield et al., 1992; Crane et al., 2000). Während einer HCMV-Infektion wurden in den Wirtszellen Chemokine und deren Rezeptoren zum Schutz gegen das Virus aktiviert und vermehrt exprimiert (Salazar-Mather et al., 2000; Morgensen & Paludan, 2001). HCMV führt zu einer erhöhten Expression der Integrine α 2 β 1, α 6 β 1, α v β 3 und des EGF-R,

welche für die Adsorption des Virus und seine Aufnahme in die Zelle verantwortlich sind (Feire et al., 2004; Wang et al., 2005). Dabei bindet HCMV mit seinen Glykoproteinen (gB und gH) gleichzeitig und unabhängig an den EGF-R in Assoziation mit gB und das Integrin $\alpha\beta3$ mit gH und induziert den EGF-R- und Scr-Signalweg. Die Expression der Integrine und des EGF-R könnten an der HCMV-induzierte Zellmigration, den inflammatorischen Antworten und der Inhibierung der Apoptose beteiligt sein. In retinalen Perizyten wurden die Expression der Integrine und der EGF-R während der HCMV-Infektion untersucht. Im Gegensatz zu den publizierten Daten werden in HRP der EGF-R und das Integrin $\alpha\beta3$ herunterreguliert. Wang et al. (2005) postulierten, dass der EGF-R und $\alpha\beta3$ für eine HCMV-Infektion erforderlich sind. Die Lungenfibroblasten (HEL) werden nicht infiziert, wenn EGF-R und/oder $\alpha\beta3$ durch einen Antikörper blockiert wird. Sie haben ebenfalls die Korrelation zwischen der Expression der viralen Gene und des EGF-R sowie des Integrins $\alpha\beta3$ untersucht. Sie behaupten, dass IE1 und IE2 nur in EGF-R und $\alpha\beta3$ positiven Zellen exprimiert werden. In retinalen Perizyten scheinen der EGF-Rezeptor und das Integrin $\alpha\beta3$ für die HCMV-Infektion ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Jedoch nicht für die Adsorption und die Aufnahme des Virus in die Zelle. Sie könnten möglicherweise für den nicht lytischen Verlauf der Infektion in Perizyten und die Inhibierung der Apoptose von Bedeutung sein. Isaacson et al. (2007) widerlegten, dass der EGF-R für eine HCMV-Infektion in Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen essentiell ist. Sie führten Blockierungsstudien für EGF-R durch und konnten zeigen, dass HCMV trotz einer EGF-R Inhibierung die Zellen infiziert. Sie postulieren jedoch, dass die $\beta1$ -Integrine für die HCMV-Infektion sehr wichtig sind.

Das Integrin $\alpha\beta1$ wird in den retinalen Perizyten herunterreguliert, $\alpha2\beta1$ hingegen wird durch HCMV hochreguliert. Dieses Phänomen wurde auch in Epithelzellen und Fibroblasten beschrieben. Dabei bindet das Glykoprotein gB direkt an die $\beta1$ Integrin-Untereinheit und vermittelt den Viruseintritt (Feire et al., 2010). Für neue therapeutische Ansätze könnten Antikörper gegen die $\beta1$ -Integrin-Untereinheiten entwickelt werden, welche die Bindung von HCMV an die Zelle blockieren. Dies könnte insbesondere für die Behandlung der HCMV-Retinitis von großer Bedeutung sein, um eine Ausbreitung des Virus in andere Gewebsschichten und ein Infektion des zweiten Auges zu verhindern.

4.2.3 ICAM-1 Expression und Leukozytenadhäsion in Perizyten

Bei einer retinalen Inflammation durch HCMV kommt es zu einer Überexpression verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1 sowie LFA-1/3. ICAM-1 interagiert mit dem β 2-Integrin (LFA-1) und MAC-1 an der Oberfläche von Leukozyten. Dadurch werden die Zellkontakte zu den Leukozyten verstärkt. Diese können in infiziertes Gewebe migrieren. Zusätzlich wird durch ICAM-1 die Ausschüttung chemotaktischer Substanzen induziert und vermehrt inflammatorisches Infiltrat gebildet (van de Stolpe & van de Saag, 1996). ICAM-1 wird durch verschiedene inflammatorische Mediatoren, wie proinflammatorische Zytokine, zellulären Stress und Virusinfektion überexprimiert.

In den infizierten Perizyten wurde die ICAM-1 Expression deutlich gesteigert. Dagegen zeigten die infizierten Vorhautfibroblasten bei einer HCMV-Infektion keine erhöhte Expression. Die gesteigerte ICAM-1 Expression ist in Perizyten, im Gegensatz zu RPE, essentiell für die Bindung von Jurkat-Zellen im Adhäsionsassay. In infizierten HRP binden, im Vergleich zu den nicht infizierten Mockzellen, fünfmal mehr Jurkat-Zellen. Diese spezifische Bindung konnte durch blockierende Antikörper für ICAM-1 und LFA-1 wieder aufgehoben werden.

Eine HCMV-induzierte ICAM-1 Überexpression wurde auch für RPE beschrieben, welche jedoch nicht die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten erhöht (Cinatl et al., 2000). Dies ist durch die HCMV-induzierte Fas-Liganden Expression in RPE Zellen bedingt, welche durch die transaktivierende Aktivität der HCMV IE-Gene induziert wird (Cinatl et al., 2000; Chiou et al., 2001). Die gleichen Ergebnisse wurden mit kokultivierten Fas positiven Jurkat-Zellen erzielt.

Die Bindung der Jurkat-Zellen an infizierte HRP könnte eine Erklärung für die Infiltrate und Einblutungen in Gefäßnähe während einer HCMV-Retinitis sein. Eine erhöhte ICAM-1 Expression wurde auch während einer diabetischen Retinopathie und Makuladegeneration (AMD) beobachtet. Verschiedene Gruppen haben eine Hochregulation von ICAM-1 in Endothelzellen beschrieben, welche mit einer erhöhten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und deren transendotheliale Migration verbunden ist (Scholz et al., 1993 & 2003). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass das murine Coronavirus eine retinale Vaskulitis und später eine retinale Degeneration verursacht, was mit der Bildung von anti-retinalen und anti-RPE Zellantikörpern verbunden ist (Hooks et al., 1993). Diese Autoimmunantwort wird mit der Expression von MHC-Molekülen und ICAM-1 in Zusammenhang gebracht.

Die Expression von ICAM-1 wird durch TNF- α , Interferon- γ und IL-1 erhöht, aber nicht durch Lipopolysaccharide, IL-6 und TGF- β (Nagineni et al., 1996). In Endothelzellen wird durch die IE-Proteine des Zytomegalievirus die ICAM-1-Expression aktiviert (Burns et al., 1999). Dies wurde durch transiente Transfektion der HRP mit IE1/2-Expressionsplasmiden bestätigt. Dabei wird besonders in mit beiden Expressionsplasmiden (IE1/2) kotransfizierten Perizyten die ICAM-1 Expression synergistisch gesteigert. Ähnliche Resultate wurden mit HFF und HUVEC erzielt (Kronschnabl & Stamminger, 2003).

4.2.4 Zytokin- und Interleukinexpression während einer HCMV-Infektion

Um weitere inflammatorische Prozesse in infizierten retinalen Perizyten zu analysieren, wurde die Sekretion der CCL2, CCL5, CXCL10, IL-6 und IL-8 Zytokine mittels qRT-PCR und ELISA-Analyse untersucht.

Bereits vor 60 Jahren wurden von Sir Peter Medawar die immunprivilegierten Eigenschaften des Gehirns, des Auges und des Uterus beschrieben (Medawar, 1948). Die Retina mit ihrer inneren und äußeren Blut-Retina Schranke hat im Auge eine besondere Bedeutung. Eine der Hauptfunktionen ist die Immunregulation durch die Produktion von Chemokinen. Chemokine sind Chemotraktanten für Leukozyten, die zu inflammatorischen Infiltraten führen können (Murphy et al., 2000; Detrick & Hooks, 2010). Die Chemokine werden in zwei Hauptklassen unterteilt; in die CC- und CXC-Klasse. Zu den CXC-Chemokinen gehört das Interleukin 8 (IL-8), welches ein wichtiger Attraktant für neutrophile Leukozyten ist (Baggiolini et al., 1995; Rollins, 1997). CXCL10 wird durch INF- γ induziert, gilt als Chemoattraktant für Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen und dendritische Zellen und fördert die T-Zellen-Adhäsion an Endothelzellen (Angiolillo et al., 1995; Dufour et al., 2002). Interleukin 6 (IL-6) agiert als pro- und antiinflammatorisches Zytokin. Es wird von T-Zellen und Makrophagen sekretiert und stimuliert die Immunantwort in verletztem Gewebe. Die Chemokine der CC-Klasse CCL2 und CCL5 sind starke Lockstoffe und Aktivatoren für Monozyten und T-Zellen (Baggiolini et al., 1995).

In HCMV-infizierten Perizyten wird Interleukin 8 stark exprimiert, was mit einer aktivierten Leukozytenmigration korreliert. Ebenso wurde in infizierten RPE Zellen eine erhöhte IL-8 Expression detektiert. In RPE und anderen Zellen wurde eine erhöhte IL-8 Sekretion im Zusammenhang mit einer verstärkten Leukozytenmigration beschrieben (Cinatl et al., 2000;

Billstrom Schroeder & Worthen 2001). Weitere Studien haben eine erhöhte IL-8 Sekretion in HCMV-infizierten Monozyten, Astrozyten und Fibroblasten gezeigt (Craigen et al., 1997; Murayama, 1998; Cinatl et al., 2000), während in primären Endothelzellen keine erhöhte IL-8 Sekretion nachzuweisen war (Billstrom Schroeder & Worthen 2001). Somit scheint IL-8 an der Bildung von Leukozyteninfiltraten nahe der Gefäße während einer HCMV-Retinitis beteiligt zu sein.

Detrick zeigte, dass CCL5 in infizierten RPE nicht erhöht wird und daher nicht an der viralen Pathogenese beteiligt ist. Dagegen wurde in infizierten HFF und primären Endothelzellen eine verstärkte Expression detektiert (Detrick et al., 1996 & 2010). In dieser Arbeit wurde die geringe Expression in HCMV-infizierten RPE bestätigt. Die HCMV-infizierten HRP sekretierten dieses Chemokin jedoch sehr stark. Für diesen Zelltyp spielt es während einer HCMV-Infektion und der T-Zellen-/Monozytenaktivierung eine bedeutende Rolle. Das Chemokin CCL2 wird in HRP überexprimiert, wohingegen in RPE Zellen keine erhöhte Sekretion detektiert wurde. Detrick et al. (1996) beschrieb eine Herunterregulation dieses Chemokins in HCMV-infizierten RPE. Dieses Ergebnis wurde von Hirsch und Shenk (1999) auch für infizierte Vorhautfibroblasten beschrieben. Sie postulieren eine negative Regulation von CCL2 durch HCMV, da im gesunden Glaskörper eine Menge von 500 – 1200 pg/ml nachweisbar ist und von retinalen Zellen produziert wird (Elner et al., 1995; Mitamura et al., 2001 & 2002). Unter pathologischen Bedingungen, wie bei einer diabetischen Retinopathie, werden jedoch höhere Mengen CCL2 produziert, was für eine mögliche Rolle von CCL2 in der retinalen Pathophysiologie spricht. In den retinalen Perizyten könnte dieses Zytokin somit eine Schlüsselrolle in der HCMV-Retinitis spielen. Als starker Lockstoff und Aktivator für Monozyten und T-Zellen, könnten die Bildung von Leukozyteninfiltraten und entzündlichen Prozesse in der Retina durch gezielte Inhibierung der CCL2-Sekretion bzw. dessen Bindung am CCL2-Rezeptor unterdrückt werden und somit die Netzhautablösung und Erblindung verhindert werden.

Das Chemokin CXCL10 wird dagegen sowohl in HRP als auch in RPE überexprimiert. Jedoch ist die Sekretion zeitlich verzögert, in HRP wird das Chemokin 6 h und 24 h p.i. und in RPE 24 h und 72 h p.i. ausgeschüttet. CXCL10 wird während einer Entzündung aufgrund erhöhten $\text{INF-}\gamma$ induziert und hat eine hohe chemoattraktive Wirkung auf Lymphozyten. Dies könnte für die entzündlichen Infiltrate und proinflammatorischen Prozesse in der Retina während der HCMV-Infektion von Bedeutung sein. Es wurde gezeigt, dass CXCL10

in der Retina verstärkt exprimiert wird und dieses Chemokin für die Autoimmunantwort während einer Coronavirus-Retinopathie verantwortlich ist (Detrick et al., 2008). Ferner wurde in infizierten RPE mit dem H5N1 Influenzastamm eine CXCL10 Überexpression detektiert und diese in Zusammenhang mit den proinflammatorischen Prozessen in der Retina gebracht (Michaelis et al., 2009).

Interleukin 6 wird sowohl als pro- als auch anti-inflammatorisches Chemokin bezeichnet und für die Leukozyteninfiltrate in der Retina verantwortlich gemacht (Elner et al., 1992; Yoshimua et al., 2009). In dieser Arbeit konnte in HCMV-infizierten HRP keine erhöhte Sekretion dieses Interleukins detektiert werden. Dagegen wurde eine Überexpression in RPE nachgewiesen. IL-6 spielt in HCMV-infizierten HRP für die proinflammatorischen Prozesse keine Rolle.

In retinalen Perizyten sind die Zytokine CCL2, CCL5, CXCL10 und IL-8 an der HCMV-Infektion beteiligt und könnten so bei der Replikation von HCMV in HRP, der Infektion anderer retinaler Zelltypen, der Bildung von Leukozyteninfiltraten in der Retina, den Einblutungen, der Nekrotisierung und Netzhautablösung involviert sein. HRP unterscheiden sich deutlich von anderen Zelltypen, u. a. von den RPE-Zellen, und könnten in Bezug auf die Zytokinexpression während einer HCMV-Infektion neue Therapieansätze zur Behandlung bieten.

4.2.4.1 Zytokin- und Interleukinexpression durch die viralen IE-Proteine

Zu überprüfen, ob die Überexpression und gesteigerte Sekretion der Zytokine durch die viralen Proteine IE1 und IE2 induziert werden, wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für diese Proteine transfiziert. In HRP wurden die Chemokine CCL5, CXCL10 und IL-8 durch IE2 oder die Kofektion mit IE1/2 überexprimiert. CCL2 wurde als einziges Chemokin nach 6 h durch IE1 vermehrt sekretiert, nach 24 h und 72 h war nur eine erhöhte Sekretion durch IE2 und IE1/2 nachweisbar. Dagegen hatten die IE-Proteine in RPE Zellen keinen Einfluss auf die CCL2-Expression, jedoch wird IL-6 gleichermaßen durch IE1, IE2 sowie beider verstärkt sekretiert.

Bedeutend ist der deutliche synergistische Effekt von IE1 und IE2 auf die IL-8 Sekretion in HRP und RPE. Dieses Chemokin scheint eine wichtige Rolle während der HCMV-Retinitis zu spielen. In HFF war, im Gegensatz zu den beiden retinalen Zelltypen, keine erhöhte Sekretion von IL-8 zu detektieren. Auffällig war die erhöhte Sekretion von CCL2 durch IE1,

IE2 und IE1/2, was vermutlich für die Infizierbarkeit bzw. Infektion von HCMV in diesen Zellen von Bedeutung ist. Die Ergebnisse bestätigen die Infektionsversuche mit Vollvirus. In den Transfektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass vor allem IE2 für die Überexpression der Chemokine in HRP und RPE verantwortlich ist. Es gibt jedoch Studien, die gegenteilige Ergebnisse postulieren. So wird beispielsweise eine Blockierung der virusinduzierten Zytokine CCL2, CCL5 und IL-8 in HFF postuliert (Taylor & Bresnahan, 2006).

4.2.4.2 Promotoranalysen mittels Reporterassay

IE2 kann zusammen mit IE1 synergistisch verschiedene Promotoren aktivieren. Darüber hinaus fungiert IE2 allein als Transaktivator zahlreicher zellulärer und viraler Promotoren (Spector et al., 1996; Mocarski et al., 2001; Harris et al., 2010). Die Mechanismen der IE2-vermittelten Transaktivierung sind nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Sie können sowohl über Protein-Protein- als auch Protein-DNA-Interaktionen erfolgen. Das IE2-Protein kann mit Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CREB, AP-1, SP-1 und NF- κ B, interagieren und auf diese Weise eine Promotoraktivierung vermitteln (Lang et al., 1995; Schwartz et al., 1996; Wara-aswapati et al., 1999). Einige Promotoren, wie der zelluläre c-Fos Promotor, werden durch IE2 über einen TATA-Box abhängigen Mechanismus durch die Wechselwirkung von IE2 mit spezifischen Transkriptionsfaktoren aktiviert (Hagemeyer et al., 1992; Caswell et al., 1993; Jupp et al., 1993). Es wurde postuliert, dass IE2 den Zellzyklus und die Apoptose beeinflusst (Castillo & Kowalik, 2004; Barrasa et al., 2005). IE2 inhibiert die Apoptose (Yu & Alwine, 2002; Hsu et al., 2004; Chiou et al., 2006) und führt in verschiedenen Zellen, wie auch in Fibroblasten, zum Zellzyklusarrest, was für eine optimale Virusreplikation notwendig ist (Murphy et al., 2000; Kronschnabl et al., 2002; Noris et al., 2002).

IE1 fungiert als Transaktivator verschiedener zellulärer und viraler Gene (Castillo & Kowalik, 2002; Reinhardt et al., 2005; Mocarski et al., 2007). Ferner wird dem viralen Protein ein anti-apoptotisches, mutagenes, mitogenes und onkogenes Potential zugeschrieben (Shen et al., 1997; Castillo & Kowalik, 2002).

Durch die Transfektion mit den Expressionsplasmiden für die IE-Proteine wurde die Sekretion verschiedener Chemokine in HRP verstärkt. Um den Einfluss der viralen Proteine auf die Zytokinpromotoren zu untersuchen, wurden Reporterassays durchgeführt.

Dazu wurden proximal zum Transkriptionsstart gelegene Promotorkonstrukte (-500 bp) und größere (-3000 bp) distal gelegene Promotorbereiche der Zytokingene getestet.

Zuerst wurden die basalen Aktivitäten der Reportergenkonstrukte der Zytokingene in den Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass der CCL2-Promotor in HRP und HFF bereits eine deutliche Reportergenaktivität zeigt. CCL2 wird in allen vaskulären Zellen, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, sekretiert. Es stimuliert die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen zu den Endothelzellen und ist wichtig für die Gefäßbildung (Karpatkin, 2007; Zhang et al., 2008). Dabei aktiviert TGF- β die Promotorregion von CCL2 durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren Smad3 und 4. Dadurch wandern Perizyten zu den Gefäßen und stabilisieren diese (Strieter et al., 2005; Charo & Ransohoff, 2006). Dies erklärt die hohe basale Aktivität des CCL2-Promotors in retinalen Perizyten. In HRP wurde eine erhöhte CCL2-Sekretion während einer diabetischen Retinopathie nachgewiesen. Dies wird mit der erhöhten Permeabilität der Gefäße in Verbindung gebracht. Durch blockierende Antikörper gegen CCL2 bildeten sich wieder neue und gesunde Gefäße (Mitamura et al., 2001; Davies et al., 2006 & 2008; Zhang et al., 2006 & 2008). Somit könnte eine Überexpression des Chemokins für die Einblutungen während der HCMV-Retinitis verantwortlich sein. Ferner induziert CCL2 die Expression proinflammatorischer Zytokine und erhöht die Induktion von Signalkaskaden, welche die inflammatorische Genexpression kontrollieren, wie z. B. NF- κ B (Hisada et al., 2000; Yamamoto et al., 2000). Der CCL2-Promotor wird in HRP strangaufwärts von -98 bp durch die Transfektion mit IE2 und IE1/2-Expressionsplasmiden aktiviert. In diesem Bereich liegen potentielle Bindungsstellen für NF- κ B, SP-1 und AP-1, welches frühere Ergebnisse bestätigen (Ueda et al., 1994 & 1997; Lawrence et al., 2006).

Die Kotransfektion der IE-Expressionsplasmide mit den Reportergenkonstrukten mit den Minimalpromotoren aus TATA-Box und NF- κ B Bindungsstellen aller Zytokingene zeigten keine erhöhte Luciferaseaktivität. NF- κ B wurde durch eine Infektion mit HCMV und die Überexpression der IE-Proteinen in HRP nicht aktiviert. Somit korrelieren die Ergebnisse miteinander. Die Transaktivierung der Zytokinpromotoren erfolgt über weiter distal gelegene Promotorbereiche, welche potentielle Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren, wie SP-1 und AP-1, enthalten. Eine mögliche Transaktivierung könnte durch AP-1 vermittelt werden, da beispielsweise im IL-8-Promotor AP-1 Bindungsstellen im Bereich

(-126/-120) liegen und das entsprechende Reporter-genkonstrukt eine erhöhte Luciferaseaktivität zeigt (Wen & Wu, 2001). Im CXCL10-Promotor befinden sich potentielle Bindungsstellen für AP-1 im Bereich von -533 bp bis -237 bp. Diese Promotorkonstrukte zeigten durch Expression der IE-Proteine die höchste Luciferaseaktivität (Borgland et al., 2000). Im CCL5-Promotor sind im Bereich von -421 bp bis -181 bp potentielle AP-1 Bindungsstellen. Für diese Reporter-genkonstrukte wurden durch die Kotransfektion mit IE1/2 auch die höchsten Luciferaseaktivitäten gemessen (Wickremasinghe et al., 2004).

Um den Einfluss der viralen Proteine auf den ICAM-1-Promotor in HRP zu untersuchen, wurde auch für das Adhäsionsmolekül Luciferase-Reporter-genanalysen durchgeführt. In HRP, sowie in den HFF-Kontrollzellen und Cos-7, wurden keine basalen Aktivitäten für die ICAM-1-Promotorgenkonstrukte gemessen. Dies war zu erwarten. Jedoch wurde durch die Koexpressionen von IE2 und IE1/2-Expressionsplasmide in den Promotorbereichen downstream von 300 bp eine erhöhte Luciferaseaktivität gemessen. Die höchste Reporter-genaktivität wurde für den ICAM-1-Promotorbereich von -716 bp bis +63 bp detektiert, in welchem sich potentielle Bindungsstellen für NF- κ B (-183/-498), SP-1 (-203/-53), AP-1 und weitere Transkriptionsfaktoren befinden. Burns et al. (1999) konnten zeigen, dass IE2 als Transaktivator des ICAM-1 Promotors fungiert. Sie postulierten eine maximale Transaktivierung des Promotors in den Bereichen > 370 bp distal vom Transkriptionstart. In HFF zeigte die Kotransfektion mit IE2, IE1/2-Expressionsplasmide und dem Promotorkonstrukt (-1509/+65) die höchste Luciferaseaktivität. Kronschnabl & Stamminger (2003) beschreiben eine sehr starke Promotoraktivierung durch den Vollvirus und IE2 in kotransfizierten Glioblastomzellen U373MG. Sie postulieren, dass an dieser starken Promotoraktivierung nicht die nahe zum Transkriptionsstartpunkt gelegenen NF- κ B Bindungsstellen beteiligt sind, sondern der ICAM-1-Promotorbereich strangabwärts von -53, in welchen potentielle AP-1- und SP-1-Bindungsstellen liegen. Sie widersprechen den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, in denen eine NF- κ B-Aktivierung durch HCMV und die NF- κ B-Bindungsstellen als wichtige Kontrollelemente für eine virusregulierte Genexpression beschrieben werden (Kowalik et al., 1993; Sun et al., 2001).

In HRP verläuft die HCMV-Infektion unabhängig von NF- κ B. Die Promotorkonstrukte nahe zum Transkriptionsstart mit NF- κ B-Bindungsstellen zeigen keine Luciferaseaktivität. Somit scheinen andere Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder die direkte Bindung von IE2 und

IE1/2 am ICAM-1-Promotor für die Transaktivierung in HRP verantwortlich zu sein. Ferner sind die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen auf die zellspezifische Promotorregulation zurückzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein optimiertes Protokoll für die Isolation und Kultivierung humaner retinaler Perizyten aus Netzhäuten menschlicher Augen entwickelt.

Hierdurch ist es nun möglich, Perizyten über 12-15 Passagen zu kultivieren. Dies ermöglichte genügend Zellen zu züchten, um die HCMV-Infektionsversuche sowie Reporteranalysen für verschiedene Zytokine durchzuführen.

Die HRP sind mit einem MOI von 2 des humanen Zytomegalievirus infizierbar. Dieser kann in HRP replizieren, und es werden die viralen Proteine IE und *late* exprimiert. Im Gegensatz zu Fibroblasten, verläuft die Infektion ohne starken CPE und die Zellen werden nicht lysiert. Ein möglicher Zellzyklusarrest von infizierten Perizyten in der G1-Phase oder S-Phase, welcher für die Virusreplikation wichtig ist, könnte mittels Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer festgestellt werden. Die nicht lytische Infektion ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Blut-Retina Schranke und somit eine Schutzfunktion der Perizyten. Durch die Produktion infektiöser Viruspartikel können andere retinale Zellen infiziert werden, dennoch bleiben die Perizyten intakt und verhindern somit weitere Einblutungen in die Retina, was z.B. bei der Zerstörung der Perizyten während einer diabetischen Mikroangiopathie der Fall ist. In infizierten HRP werden proinflammatorische Prozesse induziert. Zum einen werden der Transkriptionsfaktor AP-1 und das Adhäsionsmolekül ICAM-1 überexprimiert, zum anderen werden die Zytokine CCL2, CCL5, CXCL10 und IL-8 überexprimiert und sekretiert. In den meisten Publikationen wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B mit der HCMV-Replikation in den Wirtszellen in Zusammenhang gebracht. In infizierten HRP hingegen spielt dieser keine Rolle. Somit müsste eine mögliche Regulation der Virusreplikation durch MAPKinasen, ähnlich wie in RPE, untersucht werden.

Um eine mögliche Regulation durch die Wechselwirkung der IE-Proteine, insbesondere von IE2 mit AP-1 zu bestätigen, müssten weitere Versuche, wie z.B. EMSA- (*Electrophoretic mobility shift assay*) oder ChIP-Assay- (Chromatin-Immunopräzipitation) Analysen durchgeführt werden. Somit könnten Wechselwirkungen spezifischer Transkriptionsfaktoren mit den viralen Proteinen sowie Protein-DNA-Interaktionen nachgewiesen werden und die synergistische Wirkung von IE1 und IE2 bestätigt werden. Möglicherweise binden beide

Proteine als Komplex direkt an die Promotoren oder bilden mit anderen zellspezifischen Transkriptionsfaktoren Transaktivator Komplexe. In den meisten Zellen erfolgte die Promotoraktivierung der Zytokingene und anderer Gene durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Matsusaka et al., 1994; Murayama et al., 2000). Somit scheinen die retinalen Perizyten während einer HCMV-Retinitis eine besondere Stellung in Bezug zu ihren immunprivilegierten Eigenschaften einzunehmen und könnten als neues Zellmodell zur Untersuchung einer HCMV-Retinitis dienen. Perizyten sind durch ihren hohen Anteil in der Retina von großer Bedeutung. Sie schützen die Retina und sind für die Ausbildung, Struktur und Stabilität der Mikrogefäße verantwortlich. Perizyten schützen aktiv die Blut-Hirn Schranke und sind als Zellmodell für die Grundlagenforschung von sehr großer Bedeutung. Detailliertere Untersuchungen einer HCMV-Infektion in retinalen Perizyten könnten den Replikationsmechanismus von HCMV und die damit verbundenen inflammatorischen Prozesse während einer HCMV-Retinitis genauer aufklären. Sie könnten somit zur Etablierung neuer Therapieansätze beitragen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle retinaler Perizyten nach einer Infektion mit dem Humanen Zytomegalievirus und deren mögliche Beteiligung an einer HCMV-Retinitis untersucht. Zunächst wurde die Isolation, Kultivierung und Vermehrung von humanen retinalen Perizyten (HRP) etabliert. Eine erfolgreiche Isolation der HRP ist abhängig vom Alter des Spenders, welches unter 50 Jahren liegen sollte, als auch vom Zeitpunkt der Entnahme des Auges. Dabei sollten die Retinae spätestens nach 48 h *post mortem* aus den Augen präpariert werden. Nach Aufschluss mit einem Dispase/Kollagenase-Gemisch und Separation über ein Zellnetz wurden die isolierten Perizyten auf mit Fibronectin oder ECM (extrazelluläre Matrix) beschichtete Kulturflaschen ausgebracht. Aufgrund der Optimierung des Mediums war es zum ersten Mal möglich, humane retinale Perizyten über 12-15 Passagen zu kultivieren. Somit standen genügend Zellen zur Analyse der Infizierbarkeit mit HCMV und für die Reporteranalyse zu Verfügung.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Zellen mit HCMV infizierbar sind, jedoch keine lytische Infektion stattfindet und nur wenige Zellen einen zytopathischen Effekt zeigen. Mithilfe von Titerbestimmungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen infizierter Perizyten konnte die Virusreplikation und die Bildung reifer bzw. funktioneller Viruspartikel nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Expression der viralen IE- und *late*-Proteine in HCMV-infizierten Perizyten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und quantitativer RealTime-PCR nachgewiesen. Während einer HCMV-Infektion werden unterschiedliche inflammatorische Prozesse induziert. Dazu gehört z. B. die Aktivierung zellulärer Transkriptionsfaktoren, welche durch ihre Bindung an Promotorregionen die Transkription verschiedener Gene die für Zytokine und Adhäsionsmoleküle kodieren, und andere Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Pahl, 1999). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird als Hauptregulator für die HCMV-Replikation beschrieben, in retinalen Perizyten wird NF- κ B jedoch nicht aktiviert. Mittels Immunfluoreszenzfärbung und Genexpressionsstudien konnte ein weiterer proinflammatorischer Prozess, die Überexpression von ICAM-1, in infizierten Perizyten nachgewiesen werden. ICAM-1 bewirkt die Infiltration und Anhaftung von Leukozyten an infizierten Zellen. Durch Adhäsionsstudien wurde eine 4,6-fach gesteigerte Anhaftung an HCMV-infizierten Perizyten nachgewiesen, welche durch blockierende Antikörper wieder aufgehoben werden konnte. Durch Expressionanalysen von

Chemokin- und Interleukingenen mittels qRT-PCR und ELISA-Analysen konnten erhöhte Sekretionen von CCL2, CCL5, CXCL10 und IL-8 in HCMV-infizierten HRP nachgewiesen werden. Die Resultate einer Infektion mit Vollvirus wurden durch die Transfektion mit Expressionsplasmiden für die viralen Proteine IE1/2 bestätigt. Eine gesteigerte Expression der Zytokine wurde vor allem durch die Überexpression von IE2 und synergistisch durch IE1/2 nachgewiesen. Eine durch IE1 induzierte Expression wurde nur für CCL2 detektiert. Die viralen IE-Proteine sind potentielle Transaktivatoren viraler und zellulärer Promotoren. Ziel war es, den Einfluss auf die Promotoren der Zytokingene (von -3000bp bis 100 bp) durch Koexpression der viralen IE1/IE2-Proteine mittels Luciferase-Reportergerneassays in HRP zu untersuchen. Nur der CCL2-Promotor (-1355/+55) zeigte eine erhöhte basale Promotoraktivität. Um den Einfluss der IE-Proteine auf die Promotoren zu untersuchen, wurden Kotransfektionen mit den Expressionsplasmiden für IE1/2 und den Reportergerne-konstrukten der Zytokingene durchgeführt. Dabei zeigten die Analysen mit den Minimalpromotoren (TATA-Box/NF- κ B Bindungsstellen) keine erhöhten Luciferaseaktivitäten. NF- κ B wurde durch eine HCMV-Infektion nicht aktiviert, somit ist die Transaktivierung der Promotoren von CCL2, CCL5, CXCL10, IL-8 und ICAM-1 in infizierten Perizyten vermutlich NF- κ B unabhängig. Die Transaktivierung dieser Promotoren könnte durch AP-1 vermittelt sein, da die höchsten Luciferaseaktivitäten durch die Kotransfektion mit strangabwärts gelegenen Promotorbereichen erhalten wurden, in diesen Bereichen befinden sich potentielle Bindungsstellen für AP-1, SP-1 und anderer Transkriptionsfaktoren. Mittels Western Blot-Analyse wurde eine Induktion der Expression von AP-1 durch HCMV nachgewiesen, somit wird die HCMV-Replikation in HRP vermutlich über AP-1 vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre humane Perizyten isoliert und erstmals mit HCMV infiziert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen als Modellsystem zur Untersuchung einer HCMV-Retinitis von großer Bedeutung sind. Aufgrund ihres hohen Anteils in der Retina, ihrer schützenden Funktion für die Blut-Retina Schranke sowie ihrer Beteiligung an der HCMV-Retinitis spielen diese bisher nur wenig untersuchten Zellen, offensichtlich eine große Rolle im immunprivilegierten Auge. Für die Etablierung neuer Therapieansätze für eine HCMV-Retinitis könnten detailliertere Untersuchungen retinaler Perizyten Aufschluss über den Replikationsmechanismus von HCMV und die damit verbundenen inflammatorischen Prozesse während einer HCMV-Retinitis bieten.

6 Literaturverzeichnis

- Adair, R., Liebisch, G. W., Lerman, B. J. and Colberg-Poley, A. M. (2006). Human cytomegalovirus temporally gene expression in differentiated, immortalized retinal pigment epithelial cells. *J. Clin. Virol.* 35, 478-484.
- Allt, G. and Lawrenson, J. G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs.* 169, 1-11.
- Anderson, D. R. and Davis, E. B. (1996). Glaucoma, capillaries and pericytes. 2. Identification and characterization of retinal pericytes in culture. *Ophthalmologica.* 210, 263-268.
- Angiolillo, A. L., Sgadari, C. and Tosato, G. (1996). A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 795, 158-167.
- Antonetti, D. A. and Wolpert, E. B. (2003). Isolation and characterization of retinal endothelial cells. *Methods. Mol. Med.* 89, 365-374.
- Arvin, A. M., Fast, P., Myers, M., Plotkin, S. and Rabinovich, R. (2004). Vaccine development to prevent cytomegalovirus disease report from the national vaccine advisory committee. *Clin. Infect. Dis.* 39, 233-239.
- Baggiolini, M., Loetscher, P. and Moser, B. (1995). Interleukin-8 and the chemokine family. *Int. J. Immunopharmacol.* 17, 103-108.
- Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J. G., Reid, A. R., De Silva, S. and Allt, G. (2001). Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J. Neurocytol.* 30, 35-44.
- Barber, A. J., Antonetti, D. A. and Gardner, T.W. (2000). Altered expression of retinal occluding and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3561-3568.
- Barker, C. F. and Billingham, R. E. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 25, 1-54.
- Barnes, P. J. (1997). Nuclear factor-kappa B. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 867-870.
- Barrasa, M. I., Harel, N. Y. and Alwin, J. C. (2005). The phosphorylation status of the serine-rich region of the human cytomegalovirus 86-kilodalton major immediate-early protein IE2/IEP86 affects temporal viral gene expression. *J. Virol.* 79, 1428-1437.
- Bernardi, R. and Pandolfi, P. P. (2003). Role of PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* 22, 9048-57.
- Berrone, E., Beltramo, E., Buttiglieri, S., Tarallo, S., Rosso, A., Hammes, H. P. and Porta, M. (2009). Establishment and characterization of a human retinal pericyte line: A novel tool for the study of diabetic retinopathy. *Int. J. Mol. Med.* 23, 373-378.

- Beutler, B., Hoebe, K., Du, X. and Ulevitch, R. J. (2003). How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J. Leukoc. Biol.* 74, 479-485.
- Beyer, W. R., Westphal, M., Ostertag, W. and von Laer, D. (2002). Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J. Virol.* 76, 1488-1495.
- Billstrom Schroeder, M. and Worthen, G. S. (2001). Viral regulation of RANTES expression during human cytomegalovirus infection of endothelial cells. *J. Virol.* 75, 3383-3390.
- Bold, S., Ohlin, M., Garten, W. and Radsak, K. (1996). Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion. *J. Gen. Virol.* 77, 2297-302.
- Boldogh, I., AbuBakar, S. and Albrecht, T. (1990). Activation of proto-oncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science.* 247, 561-564.
- Boldogh, I., Fons, M. P. and Albrecht, T. (1993). Increased levels of sequence-specific DNA-binding proteins in human cytomegalovirus-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1505-1510.
- Borgland, S. L., Bowen, G. P., Wong, N. C., Libermann, T. A. and Muruve, D. A. (2000). Adenovirus vector-induced expression of the C-X-C chemokine IP-10 is mediated through capsid-dependent activation of NF-kappaB. *J. Virol.* 74, 3941-3947.
- Braun, W. and Schacherer, C. (1988). Rapid (24h) neutralization assay for the detection of antibodies to human cytomegalovirus using a monoclonal antibody to an HCMV early nuclear protein. *J. Virol. Methods* 22, 31-40.
- Britt, W. (2006). Maturation and egress. In: Arvin, A. M., Mocarski, E. S., Moore, P., et al., Editors. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press, 308-320.
- Britt, W. J. and Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 39, 401-412.
- Brown, E. P., Wing, B., Coleman, D. and Shenk, T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J. Virol.* 75, 12319-12330.
- Bryant, L. A., Mixon, P., Davidson, M., Bannister, A. J., Kouzarides, T. and Sinclair, J. H. (2000). The human cytomegalovirus 86-kilodalton major immediate-early protein interacts physically and functionally with histone acetyltransferase P/CAF. *J. Virol.* 74, 7230-7237.
- Burns, L. J., Pooley, J. C., Walsh, D. J., Vercellotti, G. M., Weber, M. L. and Kovacs, A. (1999). Intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells is activated by cytomegalovirus immediate early proteins. *Transplantation* 67, 137-144.

- Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B. and Dargan, D. J. (1998). Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *J. Struct. Biol.* 124, 70-76.
- Cancilla, P. A., Baker, R. N., Pollock, P. S. and Frommes, S.P. (1972). The reaction of pericytes of the central nervous system to exogenous protein. *Lab. Invest.* 26, 376-383.
- Caposio, P., Musso, T., Luganini, A., Inoue, H., Gariglio, M., Landolfo, S. and 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.
- Castillo, J. P. and Kowalik, T. F. (2002). Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* 290, 19-34
- Castillo, J. P. and Kowalik, T. F. (2004). HCMV infection: modulating the cell cycle and cell death. *Int. Rev. Immunol.* 23, 113-139.
- Caswell, R., Hagemeyer, C., Chiou, C. J., Hayward, G., Kouzarides, T. and Sinclair, J. (1993). The human cytomegalovirus 86K immediate early (IE) 2 protein requires the basic region of the TATA-box binding protein (TBP) for binding, and interacts with TBP and transcription factor TFIIB via regions of IE2 required for transcriptional regulation. *J. Gen. Virol.* 74, 2691-2698.
- Chambers, J., Angulo, A., Amaratunga, D., Guo, H., Jiang, Y., Wan, J. S., Bittner, B., Frueh, K., Jackson, M R., Peterson, P. A., Erlander, M. G. and Ghazal, P. (1999). DNA Microarrays of the Complex Human Cytomegalovirus Genome: Profiling Kinetic Class with Drug Sensitivity of Viral Gene Expression. *J. Virol.* 73, 5757-5766.
- Chan, G., Stinski, M. F. and Guilbert, L. J. (2004). Human cytomegalovirus-induced upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 on villous syncytiotrophoblasts. *Biol. Reprod.* 71, 797-803.
- Chang, H. M., Paulson, M., Holko, M., Rice, C. M., Williams, B. R., Marie, I. and Levy, D. E. (2004). Induction of interferon-stimulates gene expression and antiviral responses require protein deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 9578-9583.
- Chang, C. P., Vesole, D. H., Nelson, J., Oldstone, M. B. and Stinski, M. F. (1989). Identification and expression of a human cytomegalovirus early glycoprotein. *J. Virol.* 63, 3330-3337.
- Charo, I. F. and Ransohoff, R. M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* 354, 610-621.
- Chen, D. H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F. and Zhou, Z. H. (1999). Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology* 260, 10-16.

- Cherrington, J. M., Khoury, E. L. and Mocarski, E.S. (1991). Human cytomegalovirus ie2 negatively regulates alpha gene expression via a short target sequence near the transcription start site. *J. Virol.* 65, 887-896.
- Cherrington, J. M. and Mocarski, E. S. (1989). Human cytomegalovirus ie1 transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element. *J. Virol.* 63, 1435-1440.
- Chiou, S. H., Liu, J. H., Hsu, W. M., Chen, S. S., Chang, S. Y., Juan, L. J., Lin, J. C., Yang, Y. T., Wong, W. W., Liu, C. Y., Lin, Y. S., Liu, W. T. and Wu, C. W. (2001). Up-regulation of Fas ligand expression by human cytomegalovirus immediate-early gene product 2: a novel mechanism in cytomegalovirus-induced apoptosis in human retina. *J. Immunol.* 167, 4098-4103.
- Chiou, S. H., Yang, Y. P., Lin, J. C., Jhang, H. C., Yang, Y. T., Lee, C. H., Ho, L. L., Hsu, W. M., Ku, H. H., Chen, S. J., Chen, S. S., Chang, M. D., Wu, C. W. and Juan, L. J. (2006). The immediate early 2 protein of human cytomegalovirus (HCMV) mediates the apoptotic control in HCMV retinitis through up-regulation of the cellular FLICE-inhibitory protein expression. *J. Immunol.* 177, 6199-6206.
- Cinatl, J., Jr., Cinatl, J., Vogel, J. U., Rabenau, H., Kornhuber, B. and Doerr, H. W. (1996). Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cell. *Intervirology* 39, 259-269.
- Cinatl, J. jr., Blaheta, R., Bittoova, M., Scholz, M., Margraf, S., Vogel, J. U., Cinatl, J. and Doerr, H. W. (2000). Decreased neutrophil adhesion to human cytomegalovirus-infected virus-induced up-regulation of retinal pigment epithelial cells is mediated by Fas ligand independent of neutrophil apoptosis. *J. Immunol.* 165, 4405-4413.
- Cinatl, J. jr., Margraf, S., Vogel, J. U., Scholz, M., Cinatl, J. and Doerr, H. W. (2001). Human cytomegalovirus circumvents NF-kappa B dependence in retinal pigment epithelial cells. *J. Immunol.* 167, 1900-1908.
- Cinatl, J., Scholz, M., Kotchetkov, R., Vogel, J. U. and Doerr, H. W. (2004a). Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends. Mol. Med.* 10, 19-23.
- Cinatl, J., Jr., Vogel, J. U., Kotchetkov, R. and Doerr, H.W. (2004b). Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 59-77.
- Cobbs, C. S., Harkins, L., Samanta, M., Gillespie, G. Y., Bharara, S., King, P. H., Nabors, L. B., Cobbs, C. G. and Britt, W. J. (2002). Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res.* 62, 3347-3350.
- Cogan, D. G., Toussaint, D. and Kuwabara, T. (1961). Retinal vascular patters. IV. Diabetic Retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* 66, 366-378.

- Cohen, J. I. and Corey, G. R. (1985). Cytomegalovirus infection in normal host. *Medicine (Baltimore)* 64, 100-114.
- Compton, T (1993). An immortalized human fibroblast cell line is permissive for human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 67, 3644-3648.
- Craigen, J. L., Yong, K. L., Jordon, N. J., MacCormac, L. P., Westwick, J., Akbar, A. N. and Grungy, J. E. (1997). Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 92, 138-145.
- Crane, I. J., Wallace, C. A., Mckillop-Smith, S. and Forrester, J. V. (2000). Control of chemokine production at the blood-retina barrier. *Immunology* 101, 426-433.
- Cuevas, P., Gutierrez-Diaz, J. A., Reimers, D., Dujovny, M., Diaz, F. G. and Ausman, J. I. (1984). Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat. Embryol.* 170, 155-159.
- Damato, E. G. and Winnen, C. W. (2002). Cytomegalovirus infection: perinatal implications. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* 31, 86-92.
- Darland, D. C and DAmore, P. A. (2001). Cell-cell interaction in vascular development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52, 107-149.
- Darland, D. C., Massingham, L. J., Smith, S. R., Piek, E., Saint-Geniez, M. and DAmore, P.A. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* 264, 275-288.
- Davies, M. H., Eubanks, J. P. and Powers, M. R. (2006). Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol. Vis.* 12, 467-477.
- Davies, M. H., Stempel, A. J. and Powers, M. R. (2008). MCP-1 deficiency delays regression of pathologic retinal neovascularization in a model of ischemic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 4195-4202.
- Dean, D. A., Dean, B. S., Muller, S. and Smith, L. C. (1999). Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp. Cell. Res.* 253, 713-722.
- Deepak, S., Spear, P. (2001). Herpesviruses and heparin sulphate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J. Clin. Invest.* 108, 503-510.
- Demmler, G. J. (1991). Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev. Infect. Dis.* 13, 315-329.

- Dengler, T. J. and Pober, J. S. (2000). Human vascular endothelial cells stimulate memory but not naive CD8⁺ T cells to differentiate into CTL retaining an early activation phenotype. *J. Immunol.* 164, 5146-5155.
- DeNofrio, D., Hooch, T. C. and Herman, I. M. (1989). Functional Sorting of Actin Isoforms in Microvascular Pericytes. *J. Cell. Biol.* 109, 191-202.
- Detrick, B., Rhame, J., Wang, Y., Nagineni, C. N. and Hooks, J. J. (1996). Cytomegalovirus replication in human retinal pigment epithelial cells. Altered expression of viral early proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 814-825.
- Detrick, B., Nagineni, C. N., Grillone, L. R., Anderson, K. P., Henry, S. P. and Hooks, J. J. (2001). Inhibition of human cytomegalovirus replication in a human retinal epithelial cell model by antisense oligonucleotides. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 136-169.
- Detrick, B., Lee, M. T., Chin, M. S., Hooper, L. C., Chan, C. C. and Hooks, J. J. (2008). Experimental coronavirus retinopathy (ECOR): retinal degeneration susceptible mice have an augmented interferon and chemokine (CXCL9, CXCL10) response early after virus infection. *J. Neuroimmunol.* 193, 28-37.
- Detrick, B. and Hooks, J. J. (2010). Immune regulation in the retina. *Immunol. Res.* 47, 153-161.
- Diffley J. M., Wu, M., Sohn, M., Song, W., Hammad, S. M. and Lyons, T. J. (2009). Apoptosis induction by oxidized glycated LDL in human retinal capillary pericytes is independent of activation of MAPK signalling pathways. *Mol. Vis.* 15, 135-145.
- Dittmer, D. and Mocarski, E. S. (1997). Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J. Virol.* 71, 1629-1634.
- Donahue, S. and Pappas, G. D. (1961). The fine structure of capillaries in the cerebral cortex of the rat at various stages of development. *Am. J. Anat.* 108, 331-347.
- Dore-Duffy, P. (2008). Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 14, 1581-1593.
- Dore-Duffy, P., Katychew, A., Wang, X. and van Buren, E. (2006). CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 613-624.
- Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E. and Luster, A. D. (2002). IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J. Immunol.* 168, 3195-3204.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 72, 8463-8471.

- Eberth, C. J. (1871). Handbuch der Lehre von Geweben des Menschen und der Tiere. Leipzig.
- Eggers, M., Radsak, K., Enders, G. and Reschke, M. (2001). Use of recombinant glycoprotein antigens gB and gH for diagnosis of primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J. Med. Virol.* 63, 135-142.
- Egginton, S., Hudlicka, O., Brown, M. D., Graciotti, L. and Granata, A. L. (1996). In vivo pericyte- endothelial cell interaction during angiogenesis in adult cardiac and skeletal muscle. *Microvasc. Res.* 51, 213-228.
- Elner, V. M., Scales, W., Elner, S. G., Danforth, J., Kunkel, S. L. and Strieter, R. M. (1992). Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye. Res.* 54, 361-368.
- Elner, S. G., Elner, V. M., Jaffe, G. J., Stuart, A., Kunkel, S. L. and Strieter, R. M. (1995). Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Curr. Eye. Res.* 14, 1045-1053.
- Everett, R. D. and Chelbi-Alix, M. K. (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819-830.
- Fabricius, E. M., Prantl, F., Jäger, H., Holzer, E., Möller, A. and Greite, J. H. (1991). Incidence and pathogenesis of ocular symptoms in HIV infection. *Fortschr. Ophthalmol.* 86, 461-468.
- Fabricius, E. M., Lipp, T. and Kaboth, W. (1990). Acute retinal necrosis and herpes encephalitis. The key role of the ophthalmologist in diagnosing opportunistic infections in AIDS, successful therapy with acyclovir (Zovirax). *Klin. Monbl. Augenheilk.* 196, 160-165.
- Feire, A. L., Koss, H. and Compton, T. (2004). Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 15470-15475.
- Feire, A. L., Roy, R. M., Manley, K. and Compton, T. (2010). The glycoprotein B disintegrin-like domain binds beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry. *J. Virol.* 84, 10026-10037.
- Feng, Y., vom Hagen, F., Pfister, F., Djokic, S., Hoffmann, S., Back, W., Wagner, P., Lin, J., Deutsch, U. and Hammes, H. P. (2007). Impaired pericyte recruitment and abnormal retinal angiogenesis as a result of angiopoietin-2 overexpression. *Thromb. Haemost.* 97, 99-108.
- Fish, K. N., Stenglein, S. G., Ibanez, C. and Nelson, J. A. (1995). Cytomegalovirus persistence in macrophages and endothelial cells. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 99, 34-40.

- Fish, K. N., Depto, A. S., Moses, A. V., Britt, W. and Nelson, J. A. (1995). Growth kinetics of human cytomegalovirus are altered in monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* 69, 3737-3743.
- Fisher, M. (2009). Pericyte Signalling in the Neurovascular Unit. *Stroke.* 40, 13-15.
- Fletcher, J. M., Prentice, H. G. and Grundy, J. E. (1998). Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) expression and not with the CMV-induced down-regulation of cell surface class I HLA. *J. Immunol.* 161, 2365-2374.
- Forbes, B. A. (1989). Acquisition of cytomegalovirus infection: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 204-216.
- Frank, R. N., Turczyn, T. J. and Das, A. (1990). Pericytes coverage of retinal and cerebral capillaries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31, 999-1007.
- Gabrielian, K., Osusky, R., Sippy, B. D., Ryan, S. J. and Hinton, D. R. (1994). Effect of TGF-beta on interferon-gamma-induced HLA-DR expression in human retinal pigment epithel cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 4253-4259.
- Gawn, J. M. and Greaves, R. F. (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.
- Gibson, W. (2006). Assembly and maturation of the capsid. In: Reddehase, M. J., Editor. *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control.* Norfolk, United Kingdom: Caister Scientific Press, 231-344.
- Gicklhorn, D., Eickmann, M., Meyer, G., Ohlin, M. and Radsak, K. (2003). Differential effects of glycoprotein B epitop-specific antibodies on human cytomegalovirus-induced cell-cell fusion. *J. Gen. Virol.* 84, 1859-1862.
- Greaves, R. F. and Mocarski, E. S. (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.
- Grundy, J. E., Pahal, G. S. and Akbar, A. N. (1993). Increased adherence of CD2 peripheral blood lymphocytes to cytomegalovirus-infected fibroblasts is blocked by anti-LFA-3 antibody. *Immunology* 78, 413-420.
- Grundy, J. E. and Downes, K.L. (1993). Up-regulation of LFA_3 and ICAM-1 on the surface of fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Immunology* 78, 405-412.
- Hagemeier, C., Walker, S. M., Sissons, P. J. and Sinclair, J. H. (1992). The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements. *J. Gen. Virol.* 73, 2385-2393.

- Hammes, H. P., Lin, J., Renner, O., Shani, M., Lundqvist, A., Betsholtz, C., Brownlee, M. and Deutsch, U. (2002). Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 51, 3107-3112.
- Harris, S., Ahlfors, K., Ivarsson, S., Lernmark, B. and Svanberg, L. (1984). Congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. *Ear Hear.* 5, 352-355.
- Harris, S. M., Bullock, B., Westgard, E., Zhu, H., Stenberg, R. M. and Kerry, J. A. (2010). Functional properties of the human cytomegalovirus IE86 protein required for transcriptional regulation and virus replication. *J. Virol.* 84, 8839-8848.
- Haruta, M., Sasai, Y., Kawasaki, H., Amemiya, K., Ooto, S., Kitada, M., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ide, C., Honda, Y. and Takahashi, M. (2004). In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1020-1025.
- Hayhurst, G. P., Bryant, L. A., Caswell, R. C., Walker, S. M. and Sinclair, J. H. (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.
- Heimark, R. L., Twardzik, D. R., Schwartz, S. M. (1986). Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science* 233, 1078-1080.
- Heinemann, M. H. (1992). Characteristics of cytomegalovirus retinitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* 92, 12S-16S.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 126, 3047-3055.
- Helmbold, P., Wohlrab, J., Marsch, W. C. and Nayak, R. C. (2001). Human dermal pericytes express 3G5 ganglioside--a new approach for microvessel histology in the skin. *J. Cutan. Pathol.* 28, 206-210.
- Herman, I. M. and D'Amore, P. A. (1985). Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J. Cell. Biol.* 101, 43-52.
- Herman, I. M. and Jacobson, S. (1988). In situ analysis of microvascular pericytes in hypertensive rat brain. *Tissue Cell.* 20, 1-12.
- Hirsch, A. J. and Shenk, T. (1999). Human cytomegalovirus inhibits transcription of the CC chemokine MCP-1 gene. *J. Virol.* 73, 404-410.
- Hirschi, K. K. and D'Amore, P. A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardio. Res.* 32, 687-698.

- Hisada, Y., Sakurai, H. and Sugaya, T. (2000). Cell to cell interaction between mesangial cells and macrophages induces the expression of monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappaB activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 309-316.
- Ho, M. (1991). *Cytomegalovirus: Biology and Infection*, 2nd ed. New York: Plenum.
- Hofmann, H., Flöss, S. and Stamminger, T. (2000). Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J. Virol.* 74, 2510-2524.
- Hohman, T. C., Nishimura, C., Robison, W. G. jr. (1989). Aldose reductase and polyol in cultured pericytes of human retinal capillaries. *Exp. Eye Res.* 48, 55-60.
- Hohman, T.C. (2009). Opportunities and challenges in the development of combination therapy for the treatment of retinal diseases. *Retina.* 29, S51-53.
- Hooks, J. J., Percopo, C., Wang, Y. and Detrick, B. (1993). Retina and retinal pigment epithelial cell autoantibodies are produced during murine coronavirus retinopathy. *J. Immunol.* 151, 3381-3389.
- Hope, T. J., McDonald, D., Huang, X. J., Low, J. and Parslow, T. G. (1990). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: essential residues near the amino terminus. *J. Virol.* 64, 5360-5366.
- Hosoya, K. and Tomi, M. (2005). Advanced in the cell biology of transport via the inner blood-retinal barrier: establishment of the cell lines and transport functions. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1-8.
- Hsu, C. H., Chang, M. D., Tai, K. Y., Yang, Y. T., Wang, P. S., Chen, C. J., Wang, Y. H., Lee, S. C., Wu, C. W. and Juan, L. J. (2004). HCMV IE2-mediated inhibition of HAT activity downregulates p53 function. *EMBO J.* 23, 2269-2280.
- Hwang, E. S., Zhang, Z., Cai, H., Huang, D. Y., Huong, S. M., Cha, C. Y. and Hunag, E. S. (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.
- Imesch, P. D., Bindley, C. D. and Wallow, I. H. (1997). Clinicopathologic correlation of intraretinal microvascular abnormalities. *Retina.* 17, 321-329.
- Isaacson, M. K., Feire, A. L. and Comton, T. (2007). Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling. *J. Virol.* 81, 6241-6247.
- Isern, E., Gustems, M., Messerle, M., Borst, E., Ghazal, P. and Angulo, A. (2011). The activator protein 1 binding motifs within the human cytomegalovirus major immediate-early enhancer are functionally redundant and act in a cooperative manner with the NF- κ B sites during acute infection. *J. Virol.* 85, 1732-1746.

- Ito, M., Watanabe, M., Kamiya, H. and Sakurai, M. (1995). Changes of adhesion molecule (LFA-1, ICAM-1) expression on memory T cells activated with cytomegalovirus antigen. *Cell. Immunol.* 160, 8-13.
- Ivarsson, M., Sundberg, C., Farrokhnia, N., Pertoft, H., Rubin, K. and Gerdin, B. (1996). Recruitment of type I collagen producing cells from the microvasculature in vitro.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52, 2745-2756.
- Jault, F. M., Jault, J. M., Ruchti, F., Fortunato, E. A., Clark, C., Corbeil, J., Richman, D. D. and Spector, D. H. (1995). Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J. Virol.* 69, 6697-6704.
- Jorgensen, A., Wiencke, A. K., Ia Cour, M., Kaestel, C. G., Madsen, H. O., Hamann, S., Lui, G. M., Scherfig, E., Prause, J. U., Svejgaard, A., Odum, N., Nissen, M. H. and Röpke, C. (1998). Human retinal pigment epithelial cell-induced apoptosis in activated T cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1590-1599.
- Jupp, R., Hoffmann, S., Stenberg, R. M., Nelson, J. A. and Ghazal, P. (1993). Human cytomegalovirus IE86 protein interacts with promoter-bound TATA-binding protein via a specific region distinct from the autorepression domain. *J. Virol.* 67, 7539-7546.
- Kane, R. Godson, C. and O'Brien, C. (2008). Chordin-like 1, a bone morphogenic protein-4 antagonist, is upregulated by hypoxia in human retinal pericytes and plays a role in regulating angiogenesis. *Mol. Vis.* 14, 1138-1148.
- Karpatkin, S. (2007) MCP-1 muscles in on pericytes. *Blood* 109, 849-850.
- Kaur, C., Foulds, W. S. and Ling, E. A. (2008). Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin. Ophthalmol.* 2, 879-889.
- Kedhar, S. R. and Jabs, D. A. (2007). Cytomegalovirus retinitis in the era of highly active antiviral therapy. *Herpes.* 14, 66-71.
- Kern, W. V., Wagner, D. and Hirsch, H. H. (2005). Infection after organ transplantation. *Internist(Berlin)* 46, 630-642.
- Knott, R. M., Robertson, M. and Forrester, J. V. (1993). Regulation of glucose transporter (GLUT 3) and aldose reductase mRNA in bovine retinal endothelial cells and retinal pericytes in high glucose and high galactose culture. *Diabetologia.* 36, 808-812..
- Koskinen, P. K., Nieminen, M. S., Krogerus, L. A., Lemstrom, K. B., Mattila, S. P. and Hayry, P. J. (1993). Cytomegalovirus infection and accelerated cardiac allograft vasculopathy in human cardiac allografts. *J. Heart Lung transplant.* 12, 724-729.

- Kowalik, T. F., Wing, B., Haskill, J. S., Azizkhan, J. C., Baldwin, A. S. jr. and Hunag, E. S. (1993). Multiple mechanisms are implicated in the regulation of NF-kappa B activity during human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1107-1111.
- Krauss, S. (2007). Molekulare Mechanismen der Interferon-Resistenz humaner Zytomegalieviren. epub.uni-regensburg.de/10727/1/Doktorarbeit_SK_2007.pdf
- Kronschabl, M., Marschall, M. and Stamminger, T. (2002). Efficient and tightly regulated expression systems for the human cytomegalovirus major transactivator protein IE2p86 in permissive cells. *Virus. Res.* 83, 89-102.
- Kronschabl, M. and Stamminger, T. (2003). Synergistic induction of intercellular adhesion molecule-1 by the human cytomegalovirus transactivators IE2p86 and pp71 is mediated via an Sp1-binding site. *J. Gen. Virol.* 84, 61-73.
- Krueger, M. and Bechmann, I. (2010). CNS Pericytes: Concepts, Misconceptions, and a Way Out. *GLIA* 58, 1-10.
- Lafemina, R. L., Pizzorno, M. C., Mosca, J. D. and Hayward, G. S. (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.
- Lang, D., Gebert, S., Arlt, H. and Stamminger, T. (1995). Functional interaction between the human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein and the cellular transcription factor CREB. *J. Virol.* 69, 6030-6037.
- Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 9, 495-502.
- Lautenschlager, I., Halme, L., Höckerstedt, K., Krogerus, L. and Taskinen, E. (2006). Cytomegalovirus infection of the liver transplant: virological, histological, immunological, and clinical observations. *Transpl. Infect. Dis.* 8, 21-30.
- Lawrence, D. M., Seth, P., Durham, L., Diaz, F., Boursiquot, R., Ransohoff, R. M. and Major, E. O. (2006). Astrocyte differentiation selectively upregulates CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human brain-derived progenitor cells. *GLIA.* 53, 81-91.
- Leong, C. C., Chapman, T. L., Bjorkman, P. J., Formankova, D., Mocarski, E. S., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1998). Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog. *J. Exp. Med.* 187, 1681-1687.
- Li, S., MacLaughlin, F. C., Fewell, J. G., Gondo, M., Wang, J., Nicol, F., Dean, D. A. and Smith, L. C. (2001). Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid. *Gene Therapy* 8, 494-497.

- Lin, H., Zhang, Z., Zhang, H., Yan, P., Wang, Q. and Bai, L. (2009). Primary Culture of Human Blood-Retinal Barrier Cells and Preliminary Study of APOBEC3 Expression: An In Vitro Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 4436-4443.
- Lopper, M. and Compton, T. (2004). Coiled-coil domain in glycoprotein B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion. *J. Virol.* 78, 8333-8341.
- Lou, M. H. and Fortunato, E. A. (2007). Long-term infection and shedding of human cytomegalovirus in T98G glioblastoma cells. *J. Virol.* 81, 10424-10436.
- Lu, M. and Shenk, T. (1996). Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J. Virol.* 70, 8850-8857.
- Lukac, D. M., Harel, N. Y., Tanese, N. and Alwine, J. C. (1997). TAF-like function of human cytomegalovirus immediate-early proteins. *J. Virol.* 71, 7227-7239.
- Lukac, D. M., Manuppello, J. R. and Alwine, J. C. (1994). Transcriptional activation by the human cytomegalovirus immediate-early proteins: requirements for simple promoter structures and interactions with multiple components of the transcription complex. *J. Virol.* 68, 5184-5193.
- Luster, A. D. (1998). Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338, 436-445.
- Madawar, P. B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 29, 58-59.
- Mahalingsam, S., Clark, K., Matthaei, K. I. and Foster, P. S. (2001). Antiviral potential of chemokines. *Bioessays* 23, 428-435.
- Maier, C. L., Shepherd, B. R., Yi, T. and Pober, J. S. (2010). Explant outgrowth, propagation and characterization of human pericytes. *Microcirculation* 17, 367-380.
- Malm, G. and Engman, M. L. (2007). Congenital cytomegalovirus infections. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 12, 154-159.
- Marjolis, M. J., Pajovic, S., Wong, E. L., Wade, M., Jupp, R., Nelson, J. A. and Azizkhan, J. C. (1995). Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus IE1 gene product with E2F1 coincides with E2F-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription. *J. Virol.* 69, 7759-7767.
- Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T. and Akira, S. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10193-10197.

- Maul, G. G., Yu, E., Isho, A. M. and Epstein, A. L. (1995). Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J. Cell. Biochem.* 59, 498-513.
- McElroy, A. K., Dwarakanath, R. S. and Spector, D. H. (2000). Dysregulation of cyclin E gene expression in human cytomegalovirus-infected cells requires viral early gene expression and is associated with changes in the Rb-related protein p130. *J. Virol.* 74, 4192-4206.
- McVoy, M. A. and Adler, S. P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J. Virol.* 68, 1040-1051.
- Medawar, P. B. (1948). Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 29, 58-69.
- Melnick, J. L., Adam, E. and DeBakey, M. E. (1993). Cytomegalovirus and arteriosclerosis. *Eur. Heart J.* 14, Suppl K, 30-38.
- Melnick, J. L., Hu, C., Burek, J., Adam, E. and DeBakey, M. E. (1994). Cytomegalovirus DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *J. Med. Virol.* 42, 170-174.
- Mettenleiter, T. C. (2002). Brief overview on cellular virus receptors. *Virus Res.* 82, 3-8.
- Michaelis, M., Doerr, H. W. and Cinatl, J. (2009). The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia* 11, 1-9.
- Michaelis, M., Geiler, J., Klassert, D., Doerr, H. W. and Cinatl, J. jr. (2009). Infection of human retinal pigment epithelial cells with influenza A viruses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 5419-5425.
- Miller, M. D. and Krangel, M. S. (1992). Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* 12, 17-46.
- Mitamura, Y., Takeuchi, S., Matsuda, A., Taqawa, Y., Mizue, Y. and Nishihira, J. (2001). Monocyte chemotactic protein-1 in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmologica* 215, 415-418.
- Mitamura, Y., Takeuchi, S., Yamamoto, S., Yamamoto, T., Tsukahara, I., Matsuda, A., Taqawa, Y., Mizue, Y. and Nishihira, J. (2002). Monocyte chemotactic protein-1 levels in the vitreous of patients with proliferative vitreoretinopathy. *Jpn. J. Ophthalmol.* 46, 218-221.
- Mocarski, E. S. Cytomegalovirus biology and replication. (1993). In: Roizman, B., Whitley, R., Lopez, C., eds. *The Human Herpesviruses*. New York: *Raven Press*, 173-226.

- Mocarski, E. S., kemble, G. W., Lyle, J. M. and Greaves, R. F. (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.
- Mocarski, E. S., Shenk, T. and Pass, R. F. (2007). Cytomegaloviruses. In *Knipe, D. M., Howley, P. M., Editors. Fields Virology, 5th Edition, Volume Two. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2701-2772.*
- Mocarski, E. S. & Tan Courcelle, C. (2001). Cytomegalovirus and their replication. In *Fields Virology, 4th Edition, pp. 2629–2673. Edited by D. M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.*
- Mogensen, T. H. and Paludan, S. R. (2001). Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 131-150.
- Momma, Y., Nagineni, C. N., Chin, M. S., Srinivasan, K., Detrick, B. and Hooks, J. J. (2003). Differential expression of chemokines by human retinal epithelial cells infected with cytomegalovirus. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2026-2033.
- Mukhtar, M., Harley, S., Chen, P., BouHamdan, M., Patel, C., Acheampong, E. and Pomerantz, R. J. (2002). Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN. *Virology* 297, 78-88.
- Murayama, T. (1998). Interrelationship between human cytomegalovirus infection and chemokine. *Nippon Rinsho.* 56, 69-74.
- Murayama, T., Mukaida, N., Sadanari, H., Yamaguchi, N., Khabar, K. S., Tanaka, J., Matsushima, K., Mori, S. and Eizuru, Y. (2000). The immediate early gene 1 product of human cytomegalovirus is sufficient for up-regulation of interleukin-8 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 298-304.
- Murphy, A., Long, A., Volkov, Y. and Kelleher, D. (2000). Cross-linking of LFA-1 induces secretion of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta with consequent directed migration of activated lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 30, 3006-3011.
- Nagineni, C. N., Cherukuri, K. S., Kutty, V., Detrick, B. and Hooks, J. J. (2007). Interferon-gamma differentially regulates TGF-beta1 and TGF-beta2 expression in human retinal pigment epithelial cells through JAK-STAT pathway. *J. Cell Physiol.* 210, 192-200.
- Nagineni, C. N., Kutty, R. K., Detrick, B. and Hooks, J. J. (1996). Inflammatory cytokines induce intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) mRNA synthesis and protein secretion by human retinal pigment epithelial cell cultures. *Cytokine.* 8, 622-630.
- Nayak, R. C., Berman, A. B., George, K. L., Eisenbarth, G. S. and King, G. L. (1988). A monoclonal antibody (3G5)-defined ganglioside antigen is expressed on the cell surface of microvascular pericytes. *J. Exp. Med.* 167, 1003-1015.

- Nevels, M., Brune, W. and Shenk, T. (2004a). 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.
- Nevels, M., Paulus, C. and Shenk, T. (2004b). Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 17234-17239.
- Norris, K. L. and Youle, R. J. (2002). Cytomegalovirus proteins vMIA and m38.5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins. *J. Virol.* 82, 6232-6243.
- Ogawa-Goto, K., Tanaka, K., Gibson, W., Moriishi, E., Miura, Y., Kurata, T., Irie, S. and Sata, T. (2003). Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *J. Virol.* 77, 8541-8547.
- Ojala, P. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U. and 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.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Pajovic, S., Wong, E. L., Black, A. R. and Azizkhan, J. C. (1997). Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6459-6464.
- Pass, R. F. (2001). Cytomegalovirus. In *Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., et al., Editors. Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2675-2705.
- Pecorella, I., Ciardi, A., Garner, A., McCartney, A. C. and Lucas, S. (2000). Postmortem histological survey of the ocular lesions in a British population of AIDS patients. *Br. J. Ophthalmol.* 84, 1275-1281.
- Peckham, C.S. (1991). Cytomegalovirus infection: congenital and neonatal disease. *Scand J. Infect. Dis. Suppl.* 80, 82-87.
- Pizzoro, M. C. and Hayward, G. S. (1990). The IE2 gene product of human cytomegalovirus specifically down-regulate expression from the major immediate-early promoter through a target sequence located near the cap site. *J. Virol.* 64, 6154-6165.
- Prösch, S., Wendt, C. E. C., Reinke, P., Priemer, C., Oppert, M., Krüger, D. H., Volk, H. D. and Döcke, W. D. (2000). A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology* 272, 357-365.
- Radsak, K., Schneider, D., Jost, E. and Brucher, K. H. (1989). Alteration of nuclear lamina protein in human fibroblasts infected with cytomegalovirus (HCMV). *Arch. Virol.* 105, 103-112.

- Radsak, K., Brücher, K. H., Britt, W., Shiou, H., Schneider, D. and Kollert, A. (1990). Nuclear compartmentation of glycoprotein B of human cytomegalovirus. *Virology* 177, 515-522.
- Radsak, K., Kern, H., Reis, B., Reschke, M., Mockenhaupt, T. and Eickmann, M. (1995). Aspects of viral morphogenesis and of progressing and transport of viral glycoproteins. *Plenum Press New York* 295-312.
- Radsak, K., Eickmann, M., Mockenhaupt, T., Bogner, E., Kern, H., Eis-Hubinger, A. and Reschke, M. (1996). Retrieval of human cytomegalovirus glycoprotein B from the infected cell surface for virus envelopment. *Arch. Virol.* 141, 557-572.
- Rao, N. A., Zhang, J. and Ishimoto, S. (1998). Role of retinal vascular endothelial cells in development of CMV retinitis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 96, 111-126.
- Reinhardt, J., Smith, G. B., Himmelheber, C. T., Azizkhan-Clifford, J. and Mocarski, E. S. (2002). The carboxyl-terminal region of human cytomegalovirus IE1491aa contains an acidic domain that plays a regulatory role and a chromatin-tethering domain that is dispensable during viral replication. *J. Virol.* 79, 225-233.
- Regad, T. and Chelbi-Alix, M. K. (2001). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infection. *Oncogene* 20, 7274-7286.
- Rezaie, P. and Male, D. (2002). Mesoglia & microglia-a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J. Hist. Neurosci.* 11, 325-374.
- Roizman, B. and Knipe, D. M. (2001). Herpes simplex viruses and their replication. In *Fields Virology* 4th Edition 2, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2399-2459.
- Roizmann, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C. and Studdert, M. J. (1992). The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 123, 425-449.
- Roizman, B. and Baines, J. (1991). The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 63-79.
- Rollins, B. J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
- Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217-242.
- Rouget, C. (1873). Memoir sur le developement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaries sanguins et lymphatiques. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.* 5, 603-663.

- Rowe, W. P., Hartley, J. W., Waterman, S., Turner, H. C. and Huebner, R. J. (1956). Cytopathogenic agents resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 418-424.
- Rucker, H. K., Wynder, H. J. and Thomas, W. E. (2000). Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res. Bull.* 51, 363-369.
- Salazar-Mather, T. P., Hamilton, T. A. and Biron, C. A. (2000). A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J. Clin. Invest.* 105, 985-993.
- Salvant, B. S., Fortunato, E. A. and Spector, D. H. (1998). Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J. Virol.* 72, 3729-3741.
- Sambucetti, L. C., Cherrington, J. M., Wilkinson, G. W. and Mocarski, E. S. (1989). NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J.*, 4251-4258.
- Schlitt, H. J., Ross, M. and Obed, A. (2006). Split-liver transplantation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 574, 23-28.
- Scholz, M., Hamann, A., Blaheta, R. A., Auth, M. K., Encke, A. and Markus, B. H. (1993). Cytomegalovirus- and interferon-related effects on human endothelial cells. Cytomegalovirus infection reduces upregulation of HLA class II antigen expression after treatment with interferon-gamma. *Hum. Immunol.* 35, 230-238.
- Scholz, M., Doerr, H. W. and Cinatl, J. (2003). Human cytomegalovirus retinitis: pathogenicity, immune evasion and persistence. *Trends Microbiol.* 11, 171-178.
- Schwartz, R., Sommer, M. H., Scully, A. and Spector, D. H. (1994). Site-specific binding of the human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein to an early gene promoter. *J. Virol.* 68, 5313-5622.
- Sheef, E. A., Sorenson, C. M. and Sheibani, N. (2009). Attenuation of proliferation and migration of retinal pericytes in the absence of thrombospondin-1. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 296, C724-C734.
- Shen, Y., Zhu, H. and 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.
- Shepro, D. and Morel, N. M. L. (1993). Pericytes physiology. *FASEB J.* 7: 1031-1038.
- Simmen, K. A., Singh, J., Lukokonen, B. G., Lopper, M., Bittner, A., Miller, N. E., Jackson, M. R., Compton, T. and Fruh, K. (2001). Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7140-7145.

- Sims, D. E. (2000). Diversity within pericytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 842-846.
- Sims, D.E. (1991). Recent advances in pericyte biology-implications for health and disease. *Can. J. Cardiol.* 7, 431-443.
- Sisson, J. G. P., Carmichael, A. J., McKinney, N., Sinclair, J. H. and Wills, M. R. (2002). Human cytomegalovirus and immunopathology. *Springer Semin. Immunopathol.* 24, 169-185.
- Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. and Goldmacher, V. S. (2001). A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7829-7834.
- Skalli, O., Gabbiani, F. and Gabbiani, G. (1990). Action of general and alpha-smooth muscle-specific actin antibody microinjection on stress fibers of cultured smooth muscle cells. *Exp. Cell. Res.* 187, 119-125.
- Söderberg-Naucler, C. (2007). HCMV microinfection in inflammatory diseases and cancer. *Clin. Virol.* 41, 218-223.
- Spadara, S., Blessing, H., Bogner, E., Britt, W. and Mach, M. (2002). Identification of glycoprotein gpTRL10 as a structure component of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 76, 1450-1460.
- Span, A. H., Mullers, W., Miltenburg, A. M. and Bruggeman, C. A. (1991). Cytomegalovirus induced PMN adherence in relation to an ELAM-1 antigen present on infected endothelial cell monolayer. *Immunology* 72, 355-360.
- Spector, D. H. (1996). Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 39, 361-377.
- Stagno, S., Pass, R. F., Cloud, G., Britt, W. J., Henderson, R. E., Walton, P. D., Veren, D. A., Page, F. and Alford, C. A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 256, 1904-1908.
- Stewart, P.A. and Tuor, U. I. (1994). Blood-eye barriers in the rat: correlation of ultrastructure with function. *J. Comp. Neurol.* 340, 566-576.
- Stinski, M. F., Malone, C. L., Hermiston, T. W. and Liu, B. (1991). Regulation of human cytomegalovirus transcription. In: Wagner, E. K. (eds.). *Herpesvirus transcription and its control.* Boca Raton, CRC Press 245-260.
- Stinski, M. F. and Meier, J.L. (2007). Immediate-early viral gene regulation and function. In *Human Herpesviruses Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*, 1th Edition, Cambridge University Press, Chapter 17.
- Strieter, R. M., Burdick, M. D., Gomperts, B. N., Belperio, J. A. and Keane, M. P. (2005). CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 593-609.

- Sun, B., Harrowe, G., Reinhard, C., Yoshihara, C., Chu, K. and Zhuo, S. (2001). Modulation of human cytomegalovirus immediate-early gene enhancer by mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1. *J. Cell Biochem.* 83, 563-573.
- Taylor, R. T. and Bresnahan, W.A. (2006). Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. *J. Virol.* 80, 10763-10771.
- Taylor, R. T. and Bresnahan, W.A. (2006). Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression. *J. Virol.* 80, 920-928.
- Thomas, W. E. (1999). Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31, 42-57.
- Thomsen, D. R., Stenberg, R. M., Goins, W. F. and Stinski, M. F. (1984). Promotor-regulatory region of major early gene of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 659-663.
- Tilton, R. G. (1991). Capillary Pericytes: Perspectives and Future Trends. *J. Electron. Microsc. Tech.* 19, 327-344.
- Tilton, R. G., Kilo, C., Williamson, J. R. and Murch, D. W. (1979). Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvasc. Res.* 18, 336-352.
- Tilton, R. G., Kilo, C. and Williamson, J. R. (1979). Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries. *Microvasc. Res.* 18, 325-335.
- Timonen, T., Patarroyo, M. and Gahmberg, C. G. (1988). CD11a-c/CD18 and GP84 (LB-2) adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing. *J. Immunol.* 141, 1041-1046.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K. and Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell. Biol.* 60, 163-178.
- Ueda, A., Ishigatsubo, Y., Okubo, T. and Yoshimura, T. (1997). Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J. Biol. Chem.* 272, 31092-31099.
- Ueda, A., Okuda, K., Ohno, S., Shirai, A., Igarashi, T., Matsunaga, K., Fukushima, J., Kawamoto, S., Ishigatsubo, Y. and Okubo, T. (1994). NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J. Immunol.* 153, 2052-2063.

- Van de Meer, J. T. M., Drew, W. L., Bowden, R. A., Galasso, G. J., Griffith, P. D., Jabs, D. A., Katlama, C., Spector, S. A. and Whitley, R. J. (1996). Summary of the international consensus symposium on advances in the diagnosis, treatment and prophylaxis of cytomegalovirus. *Antiviral Res.* 32, 9119-9140.
- Van de Stolpe, A. and van de Saag, P. T. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* 74, 13-33.
- Verbeek, M. M., Otte-Höller, I., Wesseling, P., Ruiter, D. J. and de Waal, R. M. (1994). Induction of alpha-smooth muscle actin expression in cultured human brain pericytes by transforming growth factor-beta 1. *Am. J. Pathol.* 144, 372-382.
- Vochem, M. (2003). CMV infections of the neonate: prevalence, diagnosis, therapy. *Z. Geburtshilfe Neonatal.* 207, 114-118.
- Wakefield, D., McCluskey, P. and Palladinetti, P. (1992). Distribution of lymphocytes and cell adhesion molecules in iris biopsy specimens from patients with uveitis. *Arch. Ophthalmol.* 110, 121-125.
- Wakefield, D. and Lloyd, A. (1992). The role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory eye disease. *Cytokine.* 4, 1-5.
- Wakui, S., Furusato, M., Muto, T., Ohshige, H., Takahashi, H. and Ushigome, S. (1997). Transforming growth factor- beta and urokinase plasminogen activator present at endothelial cell-pericyte interdigitation in human granulation tissue. *Microvasc. Res.* 54, 262-269.
- Waldman, W. J., Knight, D. A. and Huang, E.H. (1998). An in vitro model of T cell activation by autologous cytomegalovirus (CMV)-infected human adult endothelial cells: contribution of CMV-enhanced endothelial ICAM-1. *J. Immunol.* 160, 3143-3151.
- Wallow, I. H., Bindley, C. D., Reboussin, D. M., Gange, S. J. and Fisher, M. R. (1993). Systemic hypertension produces pericyte changes in retinal capillaries. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 420-430.
- Wang, Y. C., Huang, C. F., Tung, S. F. and Lin, Y. S. (2000). Competition with TATA box-binding protein for binding to the TATA box implicated in human cytomegalovirus IE2-mediated transcriptional repression of cellular promoters. *DNA Cell Biol.* 19, 613-619.
- Wang, X., Huang, D. Y., Huong, S. M. and Huang, E. S. (2005). Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat. Med.* 11, 515-521.
- Wang, X., Houng, S. M., Chiu, M. L., Raab-Traub, N. and Huang, E. S. (2003). Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* 424, 456-461.

- Wang, X. and Sonenshein, G. E. (2005). Induction of the RelB NF-kappaB subunit by the cytomegalovirus IE1 protein is mediated via Jun kinase and c-Jun/Fra-2 AP-1 complexes. *J. Virol.* 79, 95-105.
- Wara-aswapati, N., Yang, Z., Waterman, W. R., Koyama, Y., Tetradis, S., Choy, B. K., Webb, A. C. and Auron, P. E. (1999). Cytomegalovirus IE2 protein stimulates interleukin 1beta gene transcription via tethering to Spi-1/PU.1. *Mol. Cell Biol.* 19, 6803-6814.
- Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C. and Fehse, B. (2008). A multicolour panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther.* 16, 698-706.
- Weller, T. H., Hanshaw, J. B. and Scott, D. E. (1960). Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12, 130-132.
- Wen, X. and Wu, G. D. (2001). Evidence for epigenetic mechanisms that silence both basal and immune-stimulated transcription of the IL-8 gene. *J. Immunol.* 166, 7290-7299.
- Wickremasinghe, M. I., Thomas, L. H., O'Kane, C. M., Uddin, J. and Friedland, J. S. (2004). Transcriptional mechanisms regulating alveolar epithelial cell-specific CCL5 secretion in pulmonary tuberculosis. *J. Biol. Chem.* 279, 27199-27210.
- Wiederholt, M., Bielka, S., Schweig, F., Lütjen-Drecoll, E. and Lepple-Wienhues, A. (1995). Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye. *Exp. Eye Res.* 61, 223-234.
- Williams, T. A., Hooper, N.M., Kenny, A.j. and Turner A.J. (1990). Molecular forms of angiotensin-converting enzyme in brain microvessels. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 887.
- Wright, H. T. jr., Goodheart, C. R. and Lielausis, A. (1964). Human Cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virology* 23, 419-424.
- Wu, M., Chen, Y., Wilson, K., Chirindel, A., Ihnat, M. A., Yu, Y., Boulton, M. E., Szweda, L. I., Ma, J. X. and Lyons, T. J. (2008). Intraretinal leakage and oxidation of LDL in diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2679-2685.
- Xing Wang, David Y. Huang, Shu-Mei Huong and Eng-Shang Huang (2005). Integrin $\alpha\beta3$ is a Coreceptor for Human Cytomegalovirus Infection. *Nat Med.* 11 (5): 515-521.
- Yamamoto, T., Eckes, B., Mauch, C., Hartmann, K. and Krieg, T. (2000). Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J. Immunol.* 164, 6174-6179.
- Yoshimura, T., Sonoda, K. H., Sugahara, M., Mochizuki, Y., Enaida, H., Oshima, Y., Ueno, A., Hata, Y., Yoshida, H. and Ishibashi, T. (2009). Comprehensive analysis of inflammatory immune mediators in vitreoretinal diseases. *PLoS ONE* 4, e8158.

- Yu, Y. and Alwine, J.C. (2002). Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositide 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J. Virol.* 76, 3731-3738.
- Yurochko, A. D. and Huang, E. S. (1999). Human cytomegalovirus binding to human monocytes induces immunoregulatory gene expression. *J. Immunol.* 162, 4806-4816.
- Yurochko, A. D., Hwang, E. S., Rasmussen, L., Keay, S., Pereira, L. and Huang, E. S. (1997). The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF-kappaB during infection. *J. Virol.* 71, 5051-5059.
- Yurochko, A. D., Mayo, M. W., Poma, E. E., Baldwin, A. S. jr. and Huang, E. S. (1997). Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J. Virol.* 71, 4638-4648.
- Yurochko, A. D., Kowalik, T. F., Huong, S. M. and Huang, E. S. (1995). Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J. Virol.* 69, 5391-5400.
- Zhang, S. X., Wang, J. J., Dashti, A., Wilson, K., Zou, M. H., Szweda, L., Ma, J. X. and Lyons, T. J. (2008). Pigment epithelium-derived factor mitigates inflammation and oxidative stress in retinal pericytes exposed to oxidized low-density lipoprotein. *J. Mol. Endocrinol.* 41, 135-143.
- Zhang, S. X., Wang, J. J., Gao, G., Shao, C., Mott, R. and Ma, J. X. (2006). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J.* 20, 323-325.
- Zhang, L. and van Santen, V. L. (1995). Interaction of bovine herpesvirus 4 (BHV-4) immediate early 2 gene product with BHV-4 thymidine kinase promoter-regulatory region. *J. Gen Virol.* 76, 2433-2445.
- Zhu, H., Cong, J. P., Mamtora, G., Gingeras, T. and Shenk, T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide array. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14470-14475.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCL	Chemokine (C-C <i>motif</i>) Ligand
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CXCL	Chemokine (C-X-C <i>motif</i>) Ligand
IL	Interleukin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CPE	zytopathischer Effekt
Cos-7	<i>Cercopithecus aethiops</i> Nierenfibroblasten
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonekleinsäue
dNTP	Desoyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	<i>early</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-R	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
gB	Glykoprotein
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

HCl	Salzsäure
HCMV	humanes Zytomegalovirus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFF	humane Vorhautfibroblasten
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HRP	humane retinale Perizyten
HUVEC	humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IE	<i>immediate early</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L	<i>late</i>
LB	Luria Bertani
LFA	<i>lymphocyte function-associate antigen</i>
M	Molar, Mol/L
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonkleinsäure
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
nm	Nanometer
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
OD	optische Dichte
p.i.	<i>post infection</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPE	retinale Pigmentepithelzellen

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time PCR</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
U	Einheiten (<i>units</i>)
UpM	Umdrehung pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

8 Veröffentlichungen

[Michaelis M](#), [Klassert D](#), [Barth S](#), [Suhan T](#), [Breitling R](#), [Mayer B](#), [Hinsch N](#), [Doerr HW](#), [Cinatl J](#), [Cinatl J Jr](#). Chemoresistance acquisition induces a global shift of expression of angiogenesis-associated genes and increased pro-angiogenic activity in neuroblastoma cells. *Mol Cancer*. 2009 Sep 29, 8:80

[Michaelis M](#), [Geiler J](#), [Klassert D](#), [Doerr HW](#), [Cinatl J Jr](#). Infection of human retinal pigment epithelial cells with influenza A viruses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Nov;50(11):5419-25. Epub 2009 Jun 24.

[Michaelis M](#), [Rothweiler F](#), [Klassert D](#), [von Deimling A](#), [Weber K](#), [Fehse B](#), [Kammerer B](#), [Doerr HW](#), [Cinatl J Jr](#). Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the murine double minute 2 antagonist nutlin-3. *Cancer Res*. 2009 Jan 15;69(2):416-21.

[Ogbomo H](#), [Michaelis M](#), [Klassert D](#), [Doerr HW](#), [Cinatl J Jr](#). Resistance to cytarabine induces the up-regulation of NKG2D ligands and enhances natural killer cell lysis of leukemic cells. *Neoplasia*. 2008 Dec;10(12):1402-10.

9 Lebenslauf

Berufspraxis

seit 2010

Laborleitung bei LOEWE im Biodiversitäts und Klima Forschungszentrum

von 2005 bis 2010

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Frankfurt am Main, im Institut für Medizinische Virologie, AG Prof. J. Cinatl
Mitarbeit am EU-Projekt „SYNLET“ und Forschungsvorhaben der Tumor- und Virusforschung, wie z.B. der Klärung von Zytostatikaresistenz-Mechanismen, Erforschung intrazellulärer Signalkaskaden bei Zytomegalie in speziellen Zellkulturen

von 2007 bis 2010

Laborkoordinatorin im des Interdisziplinären Virus-/Tumorforschungslabor im Dr. Petra-Joh-Haus der Stiftung für krebskranke Kinder, AG Prof. J.Cinatl

Studium

2004

Diplom in Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main im Fachbereich Anthropologie, unter der Betreuung von Prof. F. Schrenk
Thema: Überprüfung osteologischer Konstitutionsmerkmale an einer historischen Skelettserie aus Albersweiler (Rheinland/Pfalz)

von 1999 bis 2004

Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
Schwerpunkte: Zellbiologie, Anthropologie/Osteologie und Mikrobiologie

Berufsausbildung

von 1996 bis 1999

Ausbildung zur MTA-Labor an der Medizinischen Berufsfachschule der Uniklinik Leipzig

Schulabschluss

1996

Abitur am Franziskanerum in Meißen

Geburtsdatum

27. September 1977

Geburtsort

Meißen

10 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Hanau, den.....

.....

(Unterschrift)

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über **Die Rolle retinaler Perizyten während einer Infektion mit dem Humanen Zytomegalievirus und deren Bedeutung für eine HCMV-Retinitis** selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Hanau, den.....

.....

(Unterschrift)

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Cinatl danke ich für die Ermöglichung, die vorliegende Dissertation am Institut für Medizinische Virologie am Klinikum der Goethe Universität Frankfurt am Main durchführen zu können und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Langer danke ich vielfach für die Übernahme des Erstgutachtens, die Betreuung und Vertretung der Dissertation im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe Universität Frankfurt am Main.

Herrn Prof. Dr. T. Dingermann danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens und seine tatkräftige Unterstützung.

Dank gebührt auch dem Direktor des Institutes für Medizinische Virologie, **Herrn Prof. Dr. H.W. Doerr**, für die guten Arbeitsbedingungen an seinem Institut.

Bei allen ehemaligen und aktuellen **Mitgliedern der Arbeitsgruppe** bedanke ich mich herzlichst für die große Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre, ohne die der Laboralltag weniger angenehm gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. Jürgen Otte**, der mir, nicht nur bei molekularbiologischen Fragestellungen, stets mit Rat und Tat zu Seite stand.

Laura Pufahl danke ich für die freundliche und sehr hilfreiche Einweisung in die Technik des Promotor-Repotergenassays.

Dem Verein "Hilfe für krebskranke Kinder, Frankfurt/Main e.V." und der "Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder der Hilfe für krebskranke Kinder Frankfurt e.V." gebührt mein Dank für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Ein besonders herzlicher Dank gilt **Frau Prof. Dr. J. Dressman**.

Yvonne und Christian Tonhäuser möchte ich für Spende der Nabelschnüre ihrer Töchter danken, aus denen ich für die Arbeitsgruppe und meine Experimente HUVEC isolieren konnte.

Bei meiner Familie und meinem Mann bedanke ich mich für die großartige Unterstützung und dafür, dass sie immer für mich da sind.