Universitätsklinikum Ulm

Abteilung für Virologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mertens

Untersuchung von HCMV-induzierten parakrinen, proatherogenen Mechanismen in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und inflammatorischen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Britta Huch

aus Heilbronn

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Mertens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Balkan Cakir

Tag der Promotion: 14.11.2013

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung…… 1
1.1 Humanes Zytomegalievirus (HCMV)…….. 1
1.2 Atherosklerose……..... 2
1.3 Endothelzellen…….. 5
1.4 Glatte Muskelzellen……..... 5
1.5 Monozyten und Makrophagen……..…….. 5
1.6 Fragestellung der Arbeit…….…... 7

2. Material und Methodik…...…….…… 9
2.1 Geräte…….…... 9
2.2 Verbrauchsmaterialien……..... 10
2.3 Puffer, Lösungen, Medien und Kits……..... 10
2.4 Chemikalien, Zusätze und Antikörper……...…... 12
2.5 Viren und Zellen……..... 13
2.6 Zellkultivation und Erzeugen der konditionierten Medien…….. 14
2.7 Infektion der Endothelzellen und glatten Muskelzellen…… 14
2.8 Gewinnung der Monozyten……...…… 15
2.9 Inkubation der Monozyten…… 16
2.10 Ernten und Untersuchen der inkubierten Monozyten……. 18
2.10.1 MTS-Assay…….…..... 18
2.10.2 Spontanmigration der inkubierten Monozyten gegen RPMI-Medium……..…... 19
2.10.3 FACS-Analysen……..... 20
2.10.4 Multiplex-Suspension-Array……...…... 22
2.10.5 Gerichtete Migration frisch isolierter Monozyten gegen konditionierte Medien.. 23
2.11 Statistik…… 24

3. Ergebnisse…..…...……. 25
3.1 Morphologisches Bild der Monozytenkulturen nach Inkubation mit den konditionierten Medien…… 25
3.2 Anzahl überlebender Zellen nach Inkubation…….. 27
3.3 Messung der Proliferationsaktivität……..... 28
3.4 Spontanmigration der inkubierten Monozyten gegen RPMI-Medium……. 29
3.5 Charakterisierung der inkubierten Monozyten nach Oberflächenmerkmalen……..... 31
3.6 Bestimmung löslicher Moleküle in den konditionierten Medien……..... 34
3.7 Gerichtete Migration frisch isolierter Monozyten gegen konditionierte Medien..... 36

4. Diskussion……..... 38
4.1 Veränderte Kulturmorphologie……..... 40
4.2 Erhöhte Überlebensrate……..…….... 40
4.3 Gesteigerte Proliferationsaktivität……..... 41
4.4 Beeinflussung der Spontanmigration…… 42
4.5 Beeinflussung der Expression von Oberflächenmerkmalen……..... 43
4.6 Ausschüttung löslicher Moleküle durch infizierte Gefäßwandzellen…….. 44
4.7 Attraktion frisch isolierter Monozyten durch konditionierte Medien…….. 44
4.8 Diskussion der Methodik…….. 47

5. Zusammenfassung…… 49

6. Literaturverzeichnis…….. 51

7. Danksagung…….. 56

8. Lebenslauf…….. 57

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
ADCC	*antibody dependent cellular cytotoxicity*, Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AIDS	*acquired immunodeficiency syndrome*, erworbenes Immundefizienssyndrom
Arg	Arginin
BSA	*bovine serum albumine*, Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	*cluster of differentiation*
CO_2	Kohlendioxid
CMV	Zytomegalievirus
DC	*dendritic cells*, Dendritische Zellen
DNA	*deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
EBM	*endothelial cell basal medium*
EC	*endothelial cell*, Endothelzelle
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF(R)	*endothelial growth factor (receptor)*
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
EMMPRIN	*extracellular matrix metalloproteinase inducer*
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
FBS	*fetal bovine serum*, fetales Rinderserum
FCS	*fetal calf serum*, fetales Kälberserum
FGF	*fibroblast growth factor*, Fibroblastenwachstumsfaktor
FITC	Fluoreszeinthiozyanat
FSC	*forward scatter*, Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
G-CSF	*Granulocyte colony stimulating factor*
GM-CSF	*Granulocyte macrophage colony stimulating factor*
h	Stunden
HCAEC	*human coronary artery endothelial cells*, humane Endothelzellen der Koronararterien
HCASMC	*human coronary artery smooth muscle cells*, humane glatte Muskelzellen der Koronararterien
HCMV	humanes Zytomegalievirus
HFF	*human foreskin fibroblasts*, humane Vorhautfibroblasten
HHV	humanes Herpesvirus
HLA	*human leucocyte antigen*, humanes Leukozytenantigen
HM	Hungermedium
IC	Immunkomplex
ICAM	*Intercellular adhesion molecule*
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IP-10	*interferon-gamma inducible protein 10*
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat

LDL	*low density lipoprotein*
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MCP-1	*Macrophage chemoattracting protein-1*
MDM	*monocyte derived macrophages*
mg	Milligramm
MHC	*major histocompatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MIF	*Macrophage migration inhibitory factor*
MIP	*Macrophage inflammatory protein*
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOI	*multiplicity of infection*
MR	Mannoserezeptor
mRNA	*messenger ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-caboxymethooxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium
µl	Mikroliter
NaN_3	Natriumazid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PBMC	*peripheral blood mononuclear cells*, periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	*phosphate buffered saline*, Phosphatpuffer
PCR	*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF(R)	*platelet derived growth factor (receptor)*
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PMS	Phenazinmethosulfat
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNI	reaktive Stickstoffintermediate
ROI	reaktive Sauerstoffintermediate
rpm	*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SmBM	*smooth muscle cell basal medium*
SMC	*smooth muscle cell*, glatte Muskelzelle
SR	Scavengerrezeptor
SSC	*sideward scatter*, Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TB(40E)	endotheliotroper HCMV-Stamm
TGF-β	*transforming growth factor β*
TLR	*Toll-like receptor*
TNF	Tumornekrosefaktor
US28	virales Chemokinrezeptorhomolog
UVia	durch UV-Licht inaktiviert
VEGF(R)	*vascular endothelial growth factor (receptor)*

1. Einleitung

1.1 Humanes Zytomegalievirus (HCMV)

Das humane Zytomegalievirus gehört zur Familie der Beta-Herpesviren und wird auch Humanes Herpesvirus 5 (HHV-5) genannt. Es ist streng speziesspezifisch und zeichnet sich wie alle Herpesviren durch eine lebenslange Persistenz im Wirtsorganismus aus.
Das Genom des Zytomegalievirus ist eine unsegmentierte lineare Doppelstrang-DNA. Es wird von einem ikosaedrischen Kapsid aus viralen Proteinen, einem Tegument, und einer Lipidhülle umgeben, welche es empfindlich gegenüber Austrocknung, Detergenzien, Alkohol und Säuren macht (s. Abb. 1). Reife infektiöse Partikel haben einen Durchmesser von 150 bis 200 nm (29).

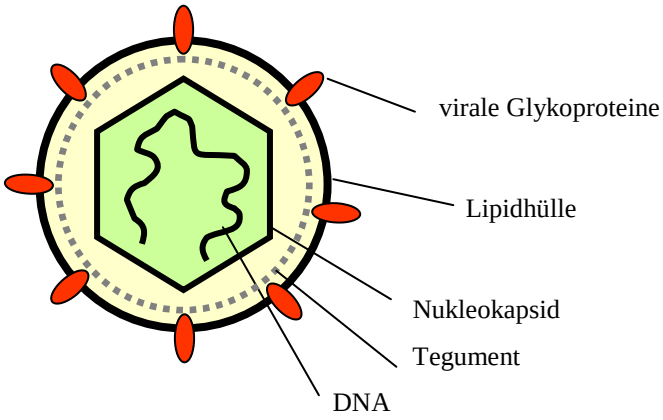


Abb. 1 Schematischer Aufbau eines humanen Zytomegalie- (HCMV)-Virions aus linearer Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäre (DNA), umgeben von Nukleokapsid, Tegument und Lipidhülle (52).

Die Übertragung findet über Tröpfchen- oder Schmierinfektion statt, möglich ist aber auch eine diaplazentare oder parenterale Transmission, zum Beispiel bei Organtransplantation oder durch Transfusionen. Das Virus ist weltweit verbreitet und der Durchseuchungsgrad richtet sich nach den herrschenden Hygieneverhältnissen. In der erwachsenen Bevölkerung industrialisierter Länder beträgt die Seroprävalenz ca. 50-80%, in Entwicklungsländern bis nahezu 100% (42). Infizierte Zellen erscheinen oft stark vergrößert und neigen zur Riesenzellbildung, woher das Virus seinen Namen erhielt. Der diagnostische Nachweis des Virus erfolgt mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) oder der Virusanzucht auf

humanen Zellen, wie zum Beispiel Fibroblasten. Sowohl Tests zum IgG- als auch zum IgM-Nachweis sind etabliert.

Die Erstinfektion mit HCMV verläuft in der Regel asymptomatisch oder mit leichten, unspezifischen Krankheitszeichen (29). Dies können Fieber, Lymphknotenschwellung, sowie Kopf- und Gliederschmerzen sein. Bei immunkompetenten Personen heilt eine akute Erkrankung problemlos wieder aus, allerdings geht das Virus in einen latenten Infektionszustand über, aus dem es lebenslang wieder reaktiviert werden kann (2). Eine endgültige Elimination des Virus durch das Immunsystem ist nicht möglich (38).

Bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem, wie Transplantatempfängern, AIDS-Patienten oder bei Patienten unter Zytostatikatherapie, kann es zu schwerwiegenden Erkrankungsbildern kommen (19). Dazu zählen Pneumonie, Hepatitis, Chorioretinitis, sowie Transplantatabstoßungen. Diese Komplikationen können tödlich verlaufen.

Ein weiteres Problem stellt die Erstinfektion von Schwangeren dar, bei der es zur intrauterinen Übertragung des Virus auf den Feten kommen kann (46). Die konnatale Infektion führt zu mehr oder weniger schweren Fehlbildungen beim Kind. Sie reichen von starker geistiger Retardierung, Mikrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen, Chorioretinitis, über Fehlbildungen im Herzkreislaufsystem, Magen-Darm-Trakt und Muskel-Skelett-System, bis hin zu Hepatosplenomegalie, Petechien oder Hörstörungen. Die Letalität der klinisch manifesten Infektion kann bis zu 30% betragen.

Es besteht auch die Möglichkeit einer perinatalen oder früh-postnatalen Infektion durch infektiöses Zervikalsekret oder über die Muttermilch. Für reife Neugeborene stellt dies keine große Gefahr dar, die Infektion verläuft meist asymptomatisch. Bei Frühgeborenen kann es allerdings zu einer schweren systemischen Erkrankung kommen.

1.2 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine Erkrankung, die durch eine Aktivierung des Immunsystems und Lipidablagerungen in der Gefäßintima charakterisiert wird (11, 21, 36). Dabei kommt es zur Bildung von sogenannten atherosklerotischen Plaques in Arterien, die bei Ruptur mit nachfolgendem thrombotischen Verschluß des Gefäßes Komplikationen wie Myokardinfarkt und Schlaganfall auslösen können. In diesen Plaques kann man verschiedene Zellen des Immunsystems finden, vor allem Monozyten/Makrophagen und T-Zellen, aber auch einige Dendritische Zellen (DC). Andere beteiligte Zellen sind

Endothelzellen und glatte Muskelzellen, dazu kommen extrazelluläre Matrix, Lipide und lipidhaltiger Zelldebris.

Atherosklerotische Läsionen entstehen in verschiedenen Stufen:

a) „Fatty Streak“:

Durch bekannte Risikofaktoren, wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Rauchen und Diabetes, kommt es gemäß der „response to injury-Hypothese“ (36) zur sogenannten „endothelialen Dysfunktion“. Lipoproteine können sich leicht in die Intima einlagern und werden verstärkt oxidiert. Außerdem exprimiert das auf diese Weise aktivierte Endothel vermehrt Zelladhäsionsmoleküle an der Oberfläche und produziert Chemokine. Es rekrutiert damit Entzündungszellen aus dem Blutstrom, die in die darunterliegende Intima einwandern und dort akkummulieren (s. Abb. 2a). Durch Aufnahme von Lipoproteinen und freien Lipiden über Scavengerrezeptoren werden die Monozyten/Makrophagen zu Schaumzellen und bilden den Hauptbestandteil dieser Vorstufe von atherosklerotischen Plaques (s. Abb. 2b). Sie kommen schon bei vielen jungen Menschen vor und verursachen keine Symptome. Bei entsprechender Lebensweise können sie sich wieder vollständig zurückbilden oder aber in ein fortgeschrittenes Stadium übergehen.

b) Reifes Atherom (stabil):

Diese Läsion besitzt einen Kern aus Schaumzellen und extrazellulären Lipiden, und eine Kappe aus eingewanderten glatten Muskelzellen der Media, umgeben von einer kollagenreichen Matrix (s. Abb. 2c). Im Kern sind neben Monozyten/Makrophagen und T-Zellen noch einige weitere Zellen des Immunsystems zu finden: Dendritische Zellen, Mastzellen und einzelne B-Zellen. Makrophagen und T-Zellen befinden sich vor allem in der sogenannten Schulterregion, von wo aus die Plaque wächst. Sie zeigen Zeichen der Aktivierung und sezernieren verschiedene proinflammatorische Zytokine wie Interferon-γ (IFN-γ), Tumornekrosefaktor (TNF-α), Interleukin 1 und 6 (IL-1, IL-6). Solange eine stabile Kappe den thrombotischen Inhalt der Plaque vor Kontakt mit dem Blutstrom schützt, ist dieses Stadium selten symptomatisch. Eine Verengung des Lumens durch die Größe des Atheroms spielt nur eine untergeordnete Rolle.

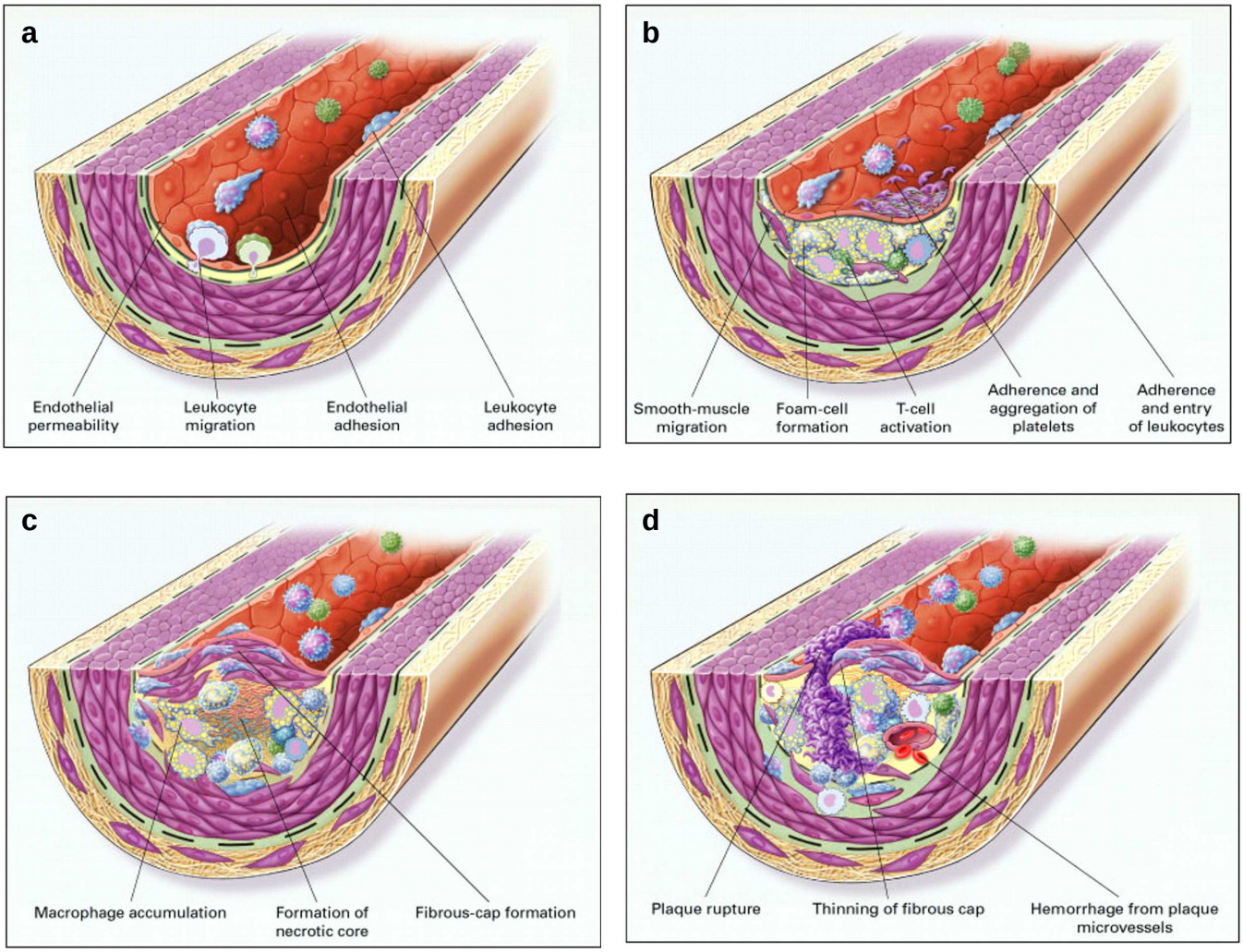


Abb. 2 „Response to injury"-Hypothese nach R. Ross: **a** Adhäsion und Invasion von Entzündungszellen aus dem Blutstrom durch das aktivierte Gefäßendothel, **b** Bildung von „Fatty Streaks" durch Aufnahme von Lipoproteinen und freien Lipiden in Entzündungszellen, **c** Bildung einer stabilen Plaque aus Lipiden und Entzündungszellen mit fibröser Kappe, **d** Einriss einer instabilen Plaque mit Thrombusbildung im Gefäßlumen und Einblutung in die Plaque (36).

c) Vulnerable Plaque (instabil):

Die vulnerable Plaque kennzeichnet ein zellarmer Kern aus lipidreichem Zelldebris und freiem Cholesterin, sowie eine dünne fibröse Kappe aus glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Von aktivierten Makrophagen freigesetzte Matrixmetalloproteinasen (MMP) bauen die kollagenreiche Extrazellulärmatrix der Kappe ab, was diese zunehmend

destabilisiert. Es besteht die Gefahr der Ruptur der Plaque mit Freisetzung des prothrombotischen Kernmaterials (s. Abb. 2d). Dies kann zum teilweisen oder kompletten Gefäßverschluss führen und dadurch einen Angina pectoris Anfall, einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall auslösen.

1.3 Endothelzellen

Endothelzellen bilden die innerste Grenzschicht in Blut- und Lymphgefäßen im gesamten Körper. Das Endothel ist ein dynamisches autokrines und parakrines Organ und reguliert entzündliche, mitogene und kontraktile Aktivitäten der Gefäßwand, sowie homöostatische Prozesse innerhalb des Gefäßlumens. Für diese Regulationsmechanismen ist u.a. das Molekül Stickstoffmonoxid (NO) verantwortlich, dessen verminderte Synthese die sogenannte endotheliale Dysfunktion im Rahmen der Atherogenese kennzeichnet (21).

1.4 Glatte Muskelzellen

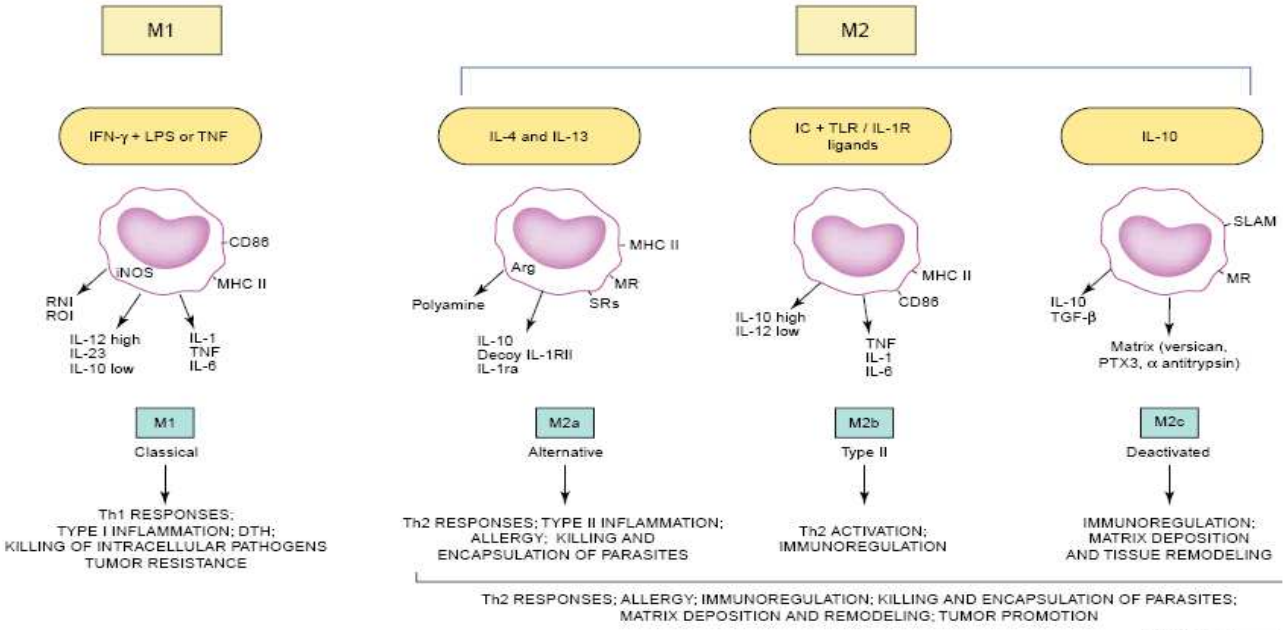
Die glatte Muskulatur bildet das kontraktile Gewebe von Blut- und Lymphgefäßen, sowie von vielen Hohlorganen. In den Gefäßen ist sie vor allem für die Blutdruckregulation zuständig. Eine weitere Aufgabe ist die Synthese von Kollagen und anderen Matrixbestandteilen. Hauptsächlich sind glatte Muskelzellen in der Media der Gefäßwand zu finden. Bei atherosklerotischen Veränderungen können sie aber verstärkt in den subintimalen Raum einwandern (49, 56).

1.5 Monozyten und Makrophagen

Monozyten sind im peripheren Blut zirkulierende, noch nicht ausdifferenzierte Zellen des Immunsystems und Vorläufer von verschiedenen gewebsständigen Makrophagen (MDM = monocyte derived macrophages) und von Dendritischen Zellen (DC = dendritic cells). Die Aufgaben dieser Leukozytenart sind die Phagozytose von körperfremden Strukturen und die Antigenpräsentation an andere Immunzellen, womit sie sowohl an der angeborenen als auch an der erworbenen Immunität beteiligt sind. Ihr Aufenthalt im Blut beträgt nur

wenige Tage, danach wandern sie ins Gewebe und differenzieren dort zu Makrophagen oder DC aus. Diese differenzierten Zellen können durchaus sehr heterogen in ihrem Erscheinungsbild sein. Verschiedene Stimuli, wie Zytokine oder mikrobielle Bestandteile, führen zur unterschiedlichen Polarisierung der Makrophagen. Angelehnt an die Nomenklatur von T-Helfer-Zellen (vom Typ Th1 und Th2) gibt es zwei Extreme eines Kontinuums, die als M1- und M2-Makrophagen bezeichnet werden (23, 24, 25). Diese Klassifizierung versucht verschiedene funktionelle Zustände des Zelltyps zu beschreiben. M1- und M2- Makrophagen, mit den drei Untergruppen M2a, M2b und M2c (s. Abb. 3), werden durch verschiedene Stimuli aktiviert und besitzen jeweils ein bestimmtes Repertoire an Oberflächenmarkern, Chemokinrezeptoren, Chemokinen und Zytokinen, und beteiligen sich an unterschiedlichen Immunreaktionen (9). Dabei zeichnen sich M1-Makrophagen durch eine Typ-1-Entzündungsreaktion mit Gewebezerstörung, sowie Abtötung intrazellulärer Pathogene und Tumorzellen aus. M2-Makrophagen unterstützen eine immunregulatorische Typ-2-Entzündungsreaktion, die auf Geweberemodelling und Angiogenese ausgerichtet ist.

Monozyten können in vivo und in vitro als Zielzellen für das humane Zytomegalievirus dienen, es findet aber nur eine latente Infektion ohne produktive Virusvermehrung statt (10). Makrophagen dagegen unterstützen eine produktive HCMV-Infektion mit komplettem viralen Replikationszyklus in der Zelle und Freisetzung neuer infektiöser Viren (39).



AAbb. 3 Aktivatoren und ausgewählte funktionelle Eigenschaften von verschieden polarisierten Makrophagenpopulationen. Kontakt mit Interferon-γ (IFN-γ) und Lipopolysaccharid (LPS) fördert eine M1- Polarisierung mit ausgeprägten zytotoxischen und „anti-Tumor“ gerichteten Eigenschaften. Dagegen sind M2-Makrophagen im Allgemeinen eher immunregulatorisch. Die gezeigte Abbildung stammt aus der Veröffentlichung von A. Mantovani et al: Trends Immunol 2004; 25 (12): 677-686 (24).

1.6 Fragestellung der Arbeit

Aufgrund der bedeutenden Rolle von Monozyten bei der Atherogenese und einem möglichen Zusammenhang zwischen einer HCMV-Infektion und der Atheroskleroseentstehung, sollte in der folgenden Arbeit die parakrine Beeinflussung der Monozytendifferenzierung durch HCMV-infizierte Gefäßwandzellen untersucht werden.
Dazu sollten Monozyten nach Inkubation mit Überständen von infizierten Endothelzellen und glatten Muskelzellen auf ihre Morphologie, ihre Überlebensraten, die Proliferationsaktivität, die Auswirkungen auf die Spontanmigration und die Expression von Oberflächenmolekülen hin untersucht werden, um eine mögliche Tendenz für die Differenzierung der Monozyten in Richtung eines eher entzündungsvermittelnden M1- oder eines eher immunregulatorischen und gewebsregenerierenden M2-Phänotyps aufzuklären (s.o.).

Die konditionierten EC- und SMC-Überstände sollten quantitativ auf ihre Zusammensetzung und auf die Fähigkeit zur Attraktion naiver Monozyten hin untersucht werden.

Dabei sollte die Frage geklärt werden, ob durch parakrine Effekte infizierter Endothelzellen und glatter Muskelzellen die für die Pathogenese von Atherosklerose entscheidende Entzündungsreaktion in der Gefäßwand aufrecht erhalten oder verstärkt wird.

2. Material und Methodik

2.1 Geräte:

Zentrifugen:
Beckmann Coulter Allegra 6 Centrifuge (Beckmann, München, Deutschland)
Eppendorf Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Heraeus Megafuge 1.0R (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Heraeus Minifuge RF (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Brutschränke:
Hera Cell 150 (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Sterile Bänke:
Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Heraeus Lamin Air HLB 2472 GS (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Vortex:
Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Deutschland)
Vortex VF2 (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland)

Kühlschränke:
Liebherr Profi Line (Liebherr, Deutschland)

Mikroskope:
Nikon TMS (Nikon, Japan)
Observer.Z1 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland)

Wasserbad GFL (GFL, Deutschland)

Pipetten:
Multipipette plus (Eppendorf, Wesseling, Deutschland)

Boyden Migration Chamber (Neuro Probe, CA, USA)

Zählkammer PJ Precisa junior 500c (Digitana AG, Hamburg, Deutschland)

FACS:
FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences Pharmigen, CA, USA)
mit Software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Biosciences Pharmigen, CA, USA)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Sarstedt Serological Pipette (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
BD Falcon Tubes (Becton Dickinson, NJ, USA)
BD Falcon Tubes FACS (Becton Dickinson, NJ, USA)
Eppendorf Tubes Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Kulturflaschen:
Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Kulturplatten:
Lumox Multiwell 24 (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland)
Cellstar 96 Well Cell Culture Plate (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland)

Filter Tips (Millipore Corp., ME, USA)
100 Sterican Einmalkanülen (B Braun, Deutschland)
BD 10ml Syringe (Becton Dickinson, USA)
Migrationsmembran Polycarbonate Membranes, 5µm pores, 25x80mm,
PVP surface treatment (Neuroprobe Inc., MD, USA)
MACS LS Columns Separation (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

2.3 Puffer, Lösungen, Medien und Kits

0,01 PBS :

- 0,15 M NaCl
- 0,01 M KH_2PO_4
- auf pH 7,8 mit NaOH

EDTA 1% in PBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Trypsin- EDTA-Lösung (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

Dulbeccos PBS (PAA Laboratories GmbH, Deutschland)

Miltenyi-Buffer:

- Dulbecco´s PBS
- 1:50 EDTA
- 0,5% BSA

Monocyte Isolation Kit II human (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

FACS:

Washing Solution:

- 0,01M PBS
- 3% FCS
- 0,01% NaN_3

Blocking Buffer:

- Washing Solution
- 10% Gamunex

PFA-Lösung 1%:

- 0,01M PBS
- 1% Paraformaldehyd

FACS-Buffer:

- 0,01M PBS
- 2% FCS
- 0,02% NaN_3

MTS-Kit CellTiter96 Aqueous One Solution (Promega Corp., WI, USA)

Trypanblau (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)

Färbeset Diff Quick (Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz)

Lymphoprep (PAA Laboratories GmbH, Deutschland)

Medien:

EBM Endothelial Cell Basal Medium (Lonza, USA)

mit Zusatz EGM-MV single quotes (BioWhittaker, Walkersville, MA)
SmBM Smooth Muscle Cell Basal Medium (Lonza, USA)
mit Zusatz SmGM Bullet Kit (BioWhittaker, Walkersville, MA)
RPMI 1640 (Gibco BLR, Eggenstein, Deutschland)

2.4 Chemikalien, Zusätze und Antikörper

NaCl (AppliChem Bio Chemika, Darmstadt, Deutschland)
KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (Seromed Invitrogen, Deutschland)
Paraformaldehyd (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
Glycin (AppliChem Bio Chemika, Darmstadt, Deutschland)
SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Wachstumsfaktoren:
GM-CSF, M-CSF (R&D Systems, Deutschland)
IL-4 (R&D Systems, Deutschland)

FCS (Gibco, USA)
FBS (Gibco, USA)

LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Antikörper :
FACS:
Isotype Control Ig1-FITC/Ig1-PE (Immunotech, Frankreich)
Isotype Control Ig1, Maus (Dako Cytomation, Deutschland)

Antikörper, gerichtet gegen humane Antigene CD14, CD86, CD206, HLA-ABC, HLA-DR, CD147, monoklonal, Maus, FITC-markiert (BD Pharmigen, NJ, USA)

Antikörper, gerichtet gegen humane Antigene CD1a, CD80, CD83, CD16, CD163, CD36, monoklonal, Maus, PE-markiert (BD Pharmigen, NJ, USA)

Gamunex 10%, 100mg/ml humanes Immunglobulin G (Talecris Biotherapeutics, Deutschland)

2.5 Viren und Zellen

TB40E: endotheliotroper HCMV-Stamm; isoliert aus dem Rachenabstrich eines Knochenmarktransplantations-Patienten durch Prof. Dr. Christian Sinzger, Universität Ulm, veröffentlicht in (40)

HCAEC: humane Koronarendothelzellen, kryokonserviert in Passage 3, verwendet in Passage 5-6 (Lonza, USA)

HCASMC: humane koronare glatte Muskelzellen, kryokonserviert in Passage 3, verwendet in Passage 5-6 (Lonza, USA)

HFF: humane Vorhautfibroblasten, verwendet zwischen Passage 15 und 18, Virologie Universitätsklinikum Ulm

humane Monozyten und PBMC: isoliert aus Buffy Coats (CMV-negativer Spender), bezogen vom Institut für klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik Ulm, isoliert und verwendet am Tag der Blutentnahme

2.6 Zellkultivierung und Erzeugen der konditionierten Medien

Für die Kultivierung der Endothelzellen wurden die Kulturflaschen zuvor mit Kollagen beschichtet. Dazu wurde 20 µl Kollagen I pro 10 cm^2 Oberfläche in PBS verdünnt und die Flaschen damit für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Zellen und das Kulturmedium hinzugefügt.
Als Kulturmedium für die Endothelzellen diente Endothelial Cell Basal Medium, für die glatten Muskelzellen Smooth Muscle Cell Basal Medium, mit entsprechenden Zusätzen und 5% FCS.
Zur Herstellung der konditionierten Medien wurden humane koronare Endothelzellen (HCAEC) und glatte Muskelzellen (HCASMC) im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, zum entsprechenden Kulturmedium gegeben und auf T75-Kulturflaschen verteilt. Nach Anwachsen der Zellen (ca. ein Tag im Brutschrank) wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um restliches Einfriermedium zu entfernen.
Für die Infektion wurden die Endothelzellen und glatten Muskelzellen bis zum Auswachsen eines konfluenten Zellrasens bei 37°C/ 5% CO_2 kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt.

2.7 Infektion der Endothelzellen und glatten Muskelzellen

Die Infektion der Endothelzellen und glatten Muskelzellen erfolgte in Passage 6 mit dem endotheliotropen HCMV-Stamm TB40E. Parallel zu einer uninfizierten Vergleichsgruppe (Mock) wurde ein weiterer Teil der Zellen mit UV-inaktiviertem TB40E-Virus inkubiert. Durch die UV-Inaktivierung (200 kJ für 2 min im CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, nach 34) verlieren die viralen Partikel ihre aktive Infektionsfähigkeit, die äußere Struktur bleibt aber erhalten.
Für die Infektion der Endothelzellen wurde ein MOI (multiplicity of infection) von 10, für die glatten Muskelzellen ein MOI von 1 verwendet. Das Ganze erfolgte in sogenanntem serumarmen Hungermedium. Damit wird eine unspezifische Aktivierung der Zellen verhindert (s. Diskussion). Dazu diente entsprechendes Basalmedium, für EC mit Zusatz von 0,1% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin, für SMC mit Zusatz von 1% FCS und 1% P/S.

Vor der Infektion wurde das bisherige Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit je 3ml Hungermedium pro Flasche gewaschen, um Reste des alten Mediums so gut wie möglich zu entfernen. Danach erfolgte die Zugabe der entsprechenden Menge Virus, beziehungsweise UV-inaktiviertes Virus, in je 3ml Hungermedium suspendiert. In diesem kleinen Volumen konnte das Virus die Zellen optimal infizieren. Nach einer Inkubation von 30 min im Brutschrank wurden weitere 4ml entsprechendes Hungermedium pro Flasche zugegeben. Mit der Vergleichsprobe wurde auf gleiche Art verfahren, lediglich ohne Zugabe des Virus zum Hungermedium.
Nach 72h Inkubation der Zellen mit Mock, UV-inaktiviertem Virus und infektiösem TB40E wurden die Kulturüberstände der Endothelzellen und glatten Muskelzellen abgenommen und von Viruspartikeln gereinigt. Dazu wurden die Überstände zuerst für 10 min bei 2300 rpm zentrifugiert, um Zelldetritus und andere größere Partikel zu entfernen. Danach erfolgte eine zweimalige Filtration bei einer Porengröße von 0,1 µm, um die Viruspartikel weitgehend aus den Medien zu eliminieren. Eine Infektiösitätskontrolle der so gewonnen konditionierten Medien auf humanen Vorhautfibroblasten (HFF) bestätigte die fast vollständige Virusfreiheit.
Bis zur weiteren Verwendung der Überstände wurden diese aliquotiert und bei -80°C eingefroren.
Alle Arbeiten wurden unter einer sterilen Laminarflow durchgeführt.

2.8 Gewinnung der Monozyten

Die Isolierung der Monozyten erfolgte aus Buffycoats HCMV-seronegativer, gesunder Spender, erworben bei der DRK Blutspendezentrale Ulm.
Zuerst wurden aus den Buffycoats periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) durch Dichtezentrifugation gewonnen, und daraus mithilfe des Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) die Monozyten laut Protokoll des Herstellers durch eine Negativselektion isoliert.

Im ersten Schritt musste der Inhalt des Buffycoat mit Magnesium- und Calcium-depletierten, endotoxinfreien PBS (sog. Dulbecco´s PBS, auf Raumtemperatur) im Verhältnis 1:2 verdünnt und vorsichtig auf Lymphoprep-Medium geschichtet werden. Durch dieses Medium mit einer Dichte von 1.077g/ml konnten während der Zentrifugation

für 25 min bei 1650 rpm (ohne Bremse) Erythrozyten und Granulozyten hindurch sedimentieren. Mononukleäre Zellen mit einer niedrigeren Dichte blieben auf der Grenzschicht zwischen Lymphoprep-Medium und Buffycoatlösung zurück und bildeten eine Bande. Diese konnten abgenommen werden und waren nach Depletion der Thrombozyten mittels PBS/EDTA 10% und mehrmaligem Waschen mit PBS bereit für die Negativselektion. Hierbei wurde nach Blockade der Fc-Rezeptoren der PBMC ein Antikörpercocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235a zugegeben, um nicht-monozytäre Zellen wie T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Dendritische Zellen zu markieren. Nach Zugabe von magnetischen Mikrobeads, welche gegen Biotin gerichtet sind, wurden die PBMC auf eine magnetische Säule gegeben. Monoyzten konnten diese ungehindert passieren, während alle markierten Nicht-Monozyten zurück gehalten wurden.
Durch diese negative Selektion der Monozyten wurde versucht, eine mögliche unspezifische Aktivierung oder eine Interferenz bei späteren Untersuchungen an Oberflächenmolekülen der Zellen zu verhindern.
Die Reinheit der mit dieser Methode gewonnenen Monozyten liegt bei über 95 % (eigene Kontrollen mittels Durchflusszytometrie bezüglich Expression von CD14, s. auch 9).

2.9 Inkubation der Monozyten

Die frisch isolierten Monozyten wurden nun mit den vorher gewonnenen konditionierten Überständen für 7 Tage inkubiert. Dafür wurden die Zellen jeweils mit einer Konzentration von 1,5 x 10^6 Monozyten pro Milliliter in speziellen Kulturplatten (LumoxMultiwell24^R), mit niedriger Möglichkeit zur Adhärenz, eingesetzt. Neben den Konditionen Überstand von Mock-, UVia TB40E-inkubierten und TB40E-infizierten Endothel-, bzw. glatten Muskelzellen, wurde zum Vergleich ein weiterer Teil der Monozyten mit frischem EC- oder SMC-Hungermedium (1% FCS, 1% P/S) inkubiert. Weiterhin wurde neben dieser „Negativkontrolle“ ein Teil der Zellen als „Positivkontrolle“ mithilfe von Wachstumsfaktoren zu Dendritischen Zellen (DC) differenziert.
Für die Differenzierung zu unreifen DC wurden die frischen Monozyten unter Zugabe von GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor, Konzentration: 100ng/ml) und IL-4 (Konzentration: 50ng/ml) in RPMI-Medium angesetzt (s. Abb. 4). Am Tag 5

wurde zur endgültigen Reifung eine LPS (Lipopolysaccharid; Konzentration: 100ng/ml)-Lösung hinzugefügt.

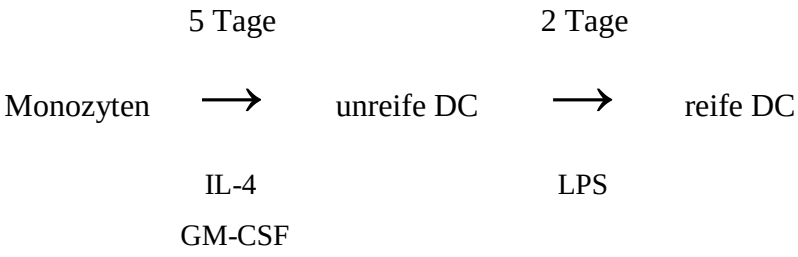


Abb. 4 Differenzierung von Monozyten zu unreifen Dendritischen Zellen (DC) durch Kultivierung mit Interleukin 4 (IL-4) und Granulozyten/Makrophagen-stimulierendem Faktor (GM-CSF), sowie unreifen zu reifen Dendritischen Zellen durch Lipopolysaccharid (LPS).

Nach dem Isolieren der Monozyten wurden diese nochmalig gewaschen und zentrifugiert, und das Pellet direkt im entsprechenden Medium resuspendiert. Diese Monozyten wurden für 7 Tage unter folgenden Konditionen kultiviert:

EC/SMC **Mock**:	konditionierter Überstand von uninfizierten Endothelzellen, bzw. glatten Muskelzellen
EC/SMC **UVia**:	konditionierter Überstand von mit UV-inaktivierten TB40E-behandelten Endothelzellen, bzw. glatten Muskelzellen
EC/SMC **TB**:	konditionierter Überstand von TB40E-infizierten Endothelzellen, bzw. glatten Muskelzellen
EC/SMC **HM**:	frisches Endothelzellen-, bzw. glatte Muskelzellen-Hungermedium
DC:	RPMI-Medium plus IL-4 und GM-CSF, plus LPS am Tag 5

Bei allen Konditionen wurde am 3.Tag die Hälfte des jeweiligen Mediums gewechselt, am 7. Tag wurden die inkubierten Monozyten geerntet. Die Kultivierung der Platten erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2.

2.10 Ernten und Untersuchen der inkubierten Monozyten

Nach 7 Tagen Inkubation mit den konditionierten Medien wurden nach Fotodokumentation (s. Abb. 5) die Monozyten vorsichtig aus den Wells abgenommen, in PBS gewaschen und mittels Zählkammer die jeweilige Anzahl vitaler Zellen bestimmt. Um tote Zellen zu identifizieren, wurde die zu zählende Monozytenprobe im Verhältnis 1:50 mit 3-prozentiger Trypanblaulösung verdünnt.

2.10.1 MTS-Assay

Der MTS-Assay (CellTiter96 Aqueous One Solution^{R}) ist ein kommerzieller, standardisierter kolorimetrischer Assay, um die Aktivität von Enzymen zu messen, welche das MTS-Reagenz zu einem farbigen Produkt reduzieren. Diese Enzyme finden sich hauptsächlich in Mitochondrien, weswegen der Assay zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität von Zellen herangezogen wird.
Gelbes MTS (=3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-caboxymethooxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) wird in Gegenwart von Phenazinmethosulfat (PMS) zu einem wasserlöslichen farbigen Formazanprodukt reduziert. Im Photometer kann bei einer Wellenlänge von 490-500nm die Absorption der farbigen Lösung gemessen und damit die Aktivität der mitochondrialen Enzyme quantifiziert werden.

Zur Durchführung des MTS-Assay wurden jeweils 7,5 x 10^4 inkubierte Monozyten jeder Kondition, suspendiert in 100 µl RPMI/1% FCS, in einer 96-Loch-Kulturplatte angesetzt. Als Referenz für die Messung im Photometer diente ein Well mit lediglich 100 µl RPMI/1%FCS.
Nach Zugabe von 20 µl MTS-Reagenz wurden die Zellen für ca. 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschlag zu erkennen war. Anschließend wurde die Absorption der einzelnen Konditionen im ELISA-Reader bei 492nm bestimmt.

2.10.2 Spontanmigration der inkubierten Monozyten gegen RPMI-Medium

Unter Zellmigration versteht man die aktive Ortsveränderung von Zellen, sowohl die ungerichtete Spontanbewegung (Chemokinese), als auch die gerichtete chemotaktische Bewegung (Chemotaxis) entlang eines Stoffkonzentrationsgradienten. Im menschlichen Organismus sind embryonale Zellen, Zelltypen des Bindegewebes und der Gefäße, manche Epithelzellen, Tumorzellen, und vor allem Zellen des Immunsystems zur Migration fähig.

Die auf unterschiedliche Weise inkubierten Monozyten sollten nun mithilfe des Boydenchamber-Assay auf ihre Fähigkeit zur Spontanmigration hin untersucht und verglichen werden. In diesem Assay werden in einer Kammer zwei mit Medium befüllbare Kompartimente durch eine Membran mit definierter Porengröße getrennt. Zellen, die in das obere Kompartiment gegeben werden, können spontan (Chemokinese) oder unter Zugabe eines chemotaktischen Agens in das untere Kompartiment (Chemotaxis) durch die Poren der Membran hindurch migrieren. Nach einer festgelegten Inkubationszeit wird die Membran entfernt, fixiert und gefärbt. Die Anzahl der migrierten Zellen kann an der Unterseite der Membran bestimmt werden.
Für diesen Assay wurde eine Suspension der geernteten Monozyten in RPMI-Medium mit Zusatz von 1% FCS hergestellt (nach 41). Die Konzentration betrug 1,5 x 10^6 Zellen pro Milliliter, damit wurde jeweils eine Anzahl von 7,5 x 10^4 Monozyten pro Loch bei Einfüllen von 50 µl im oberen Kompartiment der Boydenchamber erreicht. In das untere Kompartiment (30 µl pro Loch) wurde lediglich RPMI/1%FCS pipettiert, um die Spontanmigration der Monozyten zu untersuchen. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 37°C im Brutschrank wurde die Membran (Porengröße 5µm) entfernt und gemäß des Protokolls des Herstellers mit dem Kit DiffQuick^R fixiert und gefärbt. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurde die jeweilige Anzahl migrierter Zellen durch Auszählen von 5 repräsentativen Gesichtsfeldern (high power fields) pro Kondition unter dem hochauflösenden Ölimmersionsmikroskop (Vergrößerung x100) bestimmt (nach 9). Der Versuch wurde immer im doppelten Ansatz durchgeführt.

2.10.3 FACS-Analysen

Der Begriff „FACS“ (fluorescence activated cell sorting, geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson) wird häufig synonym zu „Durchlusszytometrie“ verwendet. Mit diesem Verfahren ist es möglich, in kurzer Zeit große Anzahlen von Zellen hinsichtlich mehrerer Merkmale zu charakterisieren. Das Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zellen bei Passage eines Laserstrahls. Mittels Detektoren kann das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) als Maß für die Größe der Zelle, und das Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward scatter) als Maß für die Granularität bestimmt werden. Desweiteren können auch Fluoreszenzfarben gemessen werden. Somit ist es zum Beispiel möglich, Zellen mithilfe von verschiedenen fluoreszenz-markierten Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenmerkmale gerichtet sind, zu charakterisieren.
Die nach siebentägiger Inkubation geernteten Monozyten wurden mit PBS gewaschen und in Blocking-Buffer resuspendiert, um eine unspezifische Bindung der fluoreszenz-markierten Antikörper zu verhindern. Die Zellsuspensionen jeder Kondition wurden folgendermaßen zu den Antikörpern pipettiert (nach 9):

Je 50µl Zellsuspension (ca. 2 x 10^4 Zellen) plus

1) 20µl Isotype control
2) 20µl FITC-CD14 + 20µl PE-CD1a
3) 20µl FITC-CD86 + 20µl PE-CD80
4) 20µl FITC-CD206 + 20µl PE-CD83
5) 20µl FITC-HLA-ABC + 20µl PE-CD16
6) 20µl FITC-HLA-DR + 20µl PE-CD163
7) 20µl FITC-CD147 + 20µl PE-CD36

Nach einer Stunde Inkubation bei 4°C in Dunkelheit wurden die Monozyten mit Washing-Solution gewaschen, zentrifugiert und das Pellet in PFA-Lösung resuspendiert. Nach Fixierung erfolgte die Aufbewahrung bis zur Untersuchung am FACS-Gerät (FACSort, Software: CellQuest Pro, Becton Dickinson) bei 4°C in Dunkelheit.

Die Antigenexpression wurde als Prozent positiver Zellen und mittlere Fluoreszenzemission (mean fluorescence intensity) im Vergleich zum Kontrollantikörper gemessen (1 x 10^4 event counts per sample).

Tabelle 1. Charakterisierung der verwendeten Oberflächenmarker:

Gruppe	Marker	Vorkommen	Funktion
Differenzierungsmarker	CD14	periphere Blutmonozyten	Rezeptor für Endotoxine (LPS, Peptidoglykan)
	CD1a	Dendritische Zellen (DC)	MHC-I-ähnlich, Antigenpräsentation
Kostimulatorische Moleküle	CD80	Makrophagen, DC, B- und T-Zellen	Aktivierung von Th2-Zellen, Ligand für CD28
	CD86	Monozyten, B-Zellen	Aktivierung von Th2-Zellen
Fc-Rezeptor	CD16	Makrophagen NK-Zellen, Neutrophile	Signaltransduktion, IgG-Rezeptor Phagozytose, ADCC
Scavenger-Rezeptoren	CD36	Monozyten, EC, SMC, Thrombozyten	Aufnahme von Matrixbestandteilen, Schaumzellbildung
	CD163	Makrophagen, Monozyten	Entzündungsreaktion, pro-inflammatorische Zytokine, Adhäsion an EC, Phagozytose
Mannoserezeptoren	CD206	Makrophagen, kultivierte DC	Phagozytose, Aktivierung und Antigenpräsentation
	CD147 = EMMPRIN	Makrophagen	Induziert Expression von MMPs
HLA-Antigene	HLA-ABC	alle kernhaltigen Zellen	= MHC-I
	HLA-DR	Antigenpräsentierende Zellen	= MHC-II, Präsentation an T-Zellen
Reifungsmarker	CD83	Zirkulierende DC	Anstieg nach Stimulation, z.B. mit LPS

2.10.4 Multiplex-Suspension-Array

Das BioPlex™ Suspension Array-System ist eine Untersuchungstechnik, bei der mithilfe von Beads bis zu 100 Zielstrukturen gleichzeitig in einer einzigen Probe analysiert werden können. So ist es möglich, viele Parameter in einer begrenzten Probenmenge zu erfassen.
Das Prinzip eines Multiplex Assay ähnelt dem eines Sandwich-Immunoassay. Ein gegen das Zielprotein gerichteter Antikörper ist kovalent mit einem farbigen Bead verknüpft. Diese Beads können nun mit einer Probe reagieren, die das Zielprotein enthält. Nach mehrfachem Waschen zur Entfernung von ungebundenem Protein, wird ein biotinylierter Nachweisantikörper hinzu gegeben, der spezifisch für ein weiteres Epitop des Zielproteins ist. Dabei entsteht ein „Sandwich“ aus Antikörpern um das Protein. Nun wird Streptavidin-PE dazu gegeben, welches an die biotinylierten Nachweisantikörper bindet. Die Aquisition der Daten erfolgt mit dem Luminex200-System®, einem mit zwei Lasern ausgestatteten, Fluss-basierten Microplate-Reader. Die Laser und die assoziierte Optik detektieren die Eigenfluoreszenz der farbigen Beads und das Fluoreszenzsignal der Nachweisantikörper. Dadurch kann jeder der Assays einzeln identifiziert und die Menge des jeweiligen Zielproteins in der Probe bestimmt werden.
Die Durchführung der Multiplex Suspension Arrays erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. M. Bachem der Abteilung Klinische Chemie der Universität Ulm. Hierfür wurden Proben der konditionierten Überstände Mock-, UVia-TB40E-, und TB40E- behandelter EC und SMC von jeweils drei unterschiedlichen Erntezeitpunkten zur Untersuchung an die Abteilung Klinische Chemie übergeben. Dabei sollte die Menge folgender Moleküle in den konditionierten Überständen ermittelt werden.

Tabelle 2. Untersuchte lösliche Moleküle in den konditionierten Überständen:

G-CSF:	Chemoattraktant, Wachstumsfaktor, gebildet von Endothelzellen, Makrophagen und anderen Immunzellen, stimuliert die Bildung von Granulozyten im Knochenmark
GM-CSF:	Wachstumsfaktor, gebildet von Makrophagen, anderen Immunzellen, Endothelzellen und Fibroblasten, stimuliert die Bildung von Granulozyten (im Knochenmark) und Makrophagen, Differenzierung von Monozyten zu M1-Makrophagen

VEGF: Signalmolekül für Vaskulo- und Angiogenese, stimuliert Migration von EC, Monozyten und Makrophagen

FGF: Wachstumsfaktor für Fibroblasten, stimuliert Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen, Einfluss auf Angiogenese und Wundheilung

IL-6: inflammatorisches Zytokin, Rekrutierung von Immunzellen, Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

IL-8: Chemokin und Entzündungsmediator, Sekretion durch Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten, chemotaktische Rekrutierung von Entzündungszellen, Angiogenesefaktor

IL-10: anti-inflammatorisches Zytokin, Sekretion durch Th2-Zellen und Monozyten, Differenzierung von Monozyten zu M2c-Makrophagen

MCP-1: proinflammatorisches Zytokin, wirkt chemotaktisch auf Monozyten/ Makrophagen, T-Zellen, DC, induziert Proliferation von SMC, Sekretion anderer pro-inflammatorischer Zytokine und Differenzierung von Monozyten zu Schaumzellen

TNF-α: inflammatorisches Zytokin, wirkt auf verschiedene Immunzellen, regt Makrophagen zur Phagozytose an

2.10.5 Gerichtete Migration frisch isolierter Monozyten gegen konditionierte Medien

Um die konditionierten Medien näher charakterisieren zu können, wurde ein Boydenchamber-Assay mit frisch isolierten Monozyten durchgeführt. Diese wurden nach der Gewinnung aus Buffycoats (wie bereits oben beschrieben) mit je 7,5 x 10^4 Zellen pro Loch in das obere Kompartiment der Kammer gegeben. In das untere Kompartiment wurden im doppelten Ansatz die verschiedenen konditionierten Medien pipettiert. Nach einer Inkubation für 1,5 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank wurde die Membran entfernt, fixiert und gefärbt, und der Anteil migrierter Monozyten pro Kondition bestimmt.

2.11 Statistik

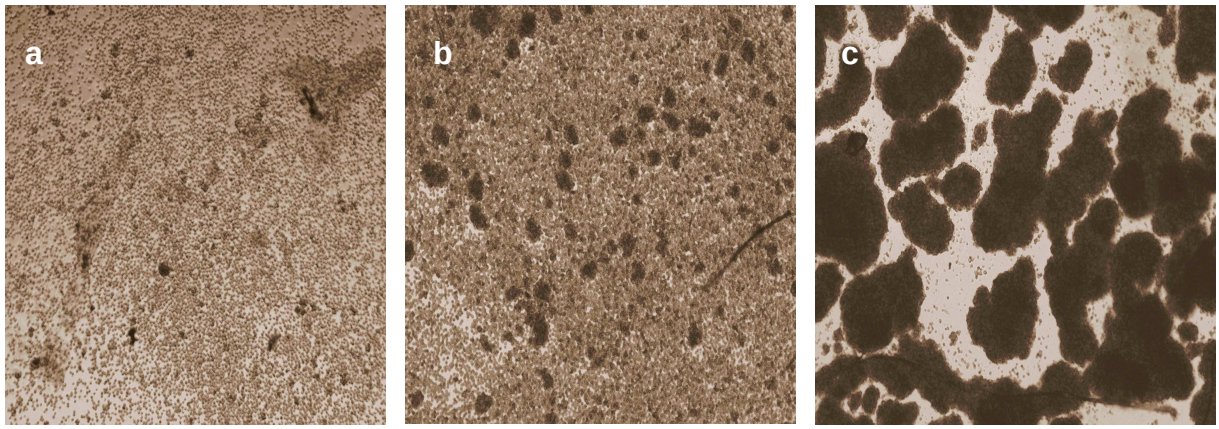
Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mithilfe des Programms Graph Pad Prism5^{R}. Ein p-Wert kleiner 0,05 im paired t-Test wurde als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

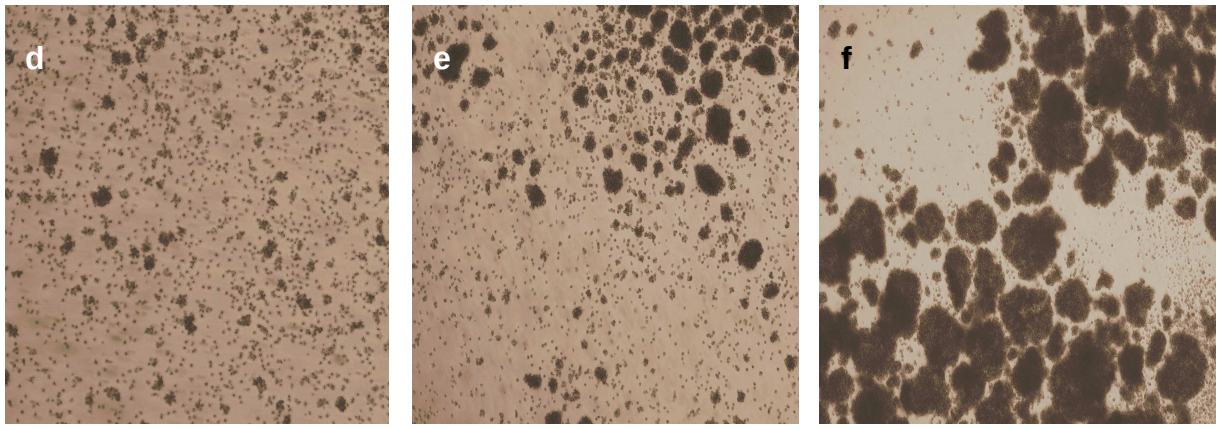
In der vorliegenden Arbeit wurde die potentielle parakrine, proatherogene Beeinflussung der Monozytendifferenzierung durch mit dem humanen Zytomegalievirus infizierte Gefäßwandzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden humane Koronarendothelzellen und glatte Muskelzellen mit dem HCMV-Isolat TB40E infiziert und aus den Überständen dieser infizierten Zellkulturen sogenannte konditionierte Medien gewonnen, parallel dazu auch Überstände von nicht-infizierten und mit UV-inaktiviertem Virus behandelten Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Frisch isolierte Monozyten wurden mit den konditionierten Medien inkubiert und anschließend auf eine mögliche proatherogene Differenzierung hin untersucht. Desweiteren wurden die erzeugten konditionierten Medien näher untersucht.

3.1 Morphologisches Bild der Monozytenkulturen nach Inkubation mit den konditionierten Medien

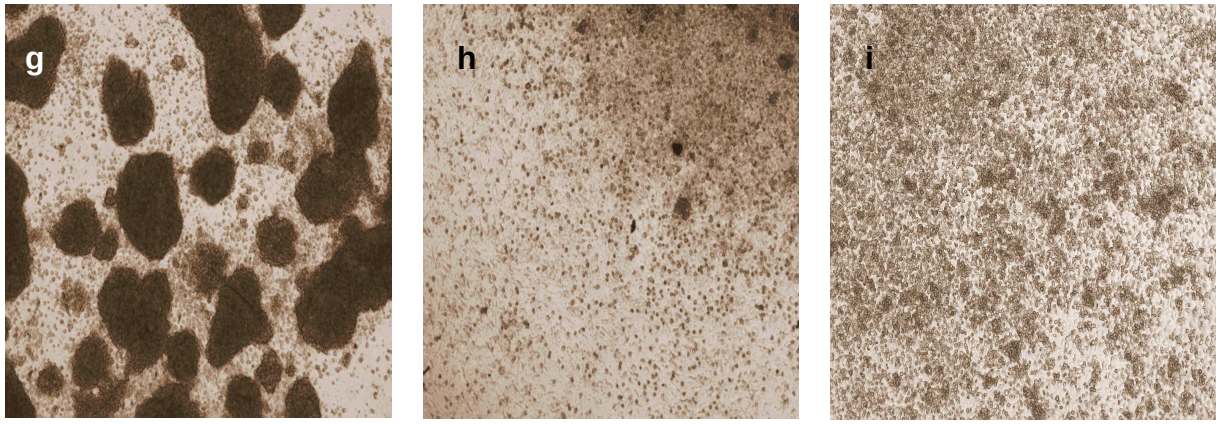
Vor dem Ernten am 7. Tag fertigten wir jeweils Fotografien der inkubierten Monozyten an, um die Kulturmorphologien zu dokumentieren (s. Abb. 5).
Hierbei fiel auf, dass die verschieden inkubierten Monozyten unterschiedlich stark aggregieren. Die kleinsten Zellaggregate gab es bei den mit Überständen von nicht-infizierten EC (s. Abb. 5a) und SMC (d) inkubierten, und bei den mit frischem EC- (h) und SMC-Hungermedium (i) inkubierten Monozyten. Größere Aggregate bildeten diejenigen Monozyten, die mit den Überständen von UVia-TB40E behandelten EC (b) und SMC (e) inkubiert wurden. Die größten Zellaggregate fanden sich aber bei Monozyten, die mit Überständen von TB40E-infizierten EC (c) und SMC (f) inkubiert wurden und bei den mithilfe von Wachstumsfaktoren zu reifen DC differenzierten Zellen (g).
Dabei verhielten sich die Konditionen (Mock, UVia, TB, HM) der Überstände von Endothelzellen und glatten Muskelzellen jeweils ähnlich.



EC Mock EC UVia EC TB



SMC Mock SMC UVia SMC TB



DC HM EC HM SMC

Abb. 5 Fotografien der mit verschiedenen Überständen (ohne Viruszugabe behandelt [Mock], mit Ultraviolettlicht inaktiviertem Virus behandelt [UVia], mit infektiösem Virus behandelt [TB]) von **Endothelzellen (EC)** (a-c) und **glatten Muskelzellen (SMC)** (d-f) für 7 Tage inkubierten Monozyten, sowie zu **Dendritischen Zellen (DC)** (g) differenzierten und mit **Hungermedium von Endothelzellen (HM EC)** (h), bzw. **von glatten Muskelzellen (HM SMC)** (i) inkubierten Monozyten, Vergrößerung x40.

3.2 Anzahl überlebender Zellen nach Inkubation

Nach dem Ernten der inkubierten Monozyten am 7. Tag wurde für jede Kondition die Anzahl überlebender Zellen bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Zellzahlen der einzelnen Experimente in Prozent der Kondition Mock umgerechnet und Mock=100% gesetzt, da die Anzahl überlebender Zellen nach der Inkubation zwischen den einzelnen Spendern zum Teil sehr verschieden war. Es wurden die Ergebnisse von jeweils 8 Ansätzen ausgewertet, die nachfolgend als Mittelwerte mit Standardfehler grafisch dargestellt sind.

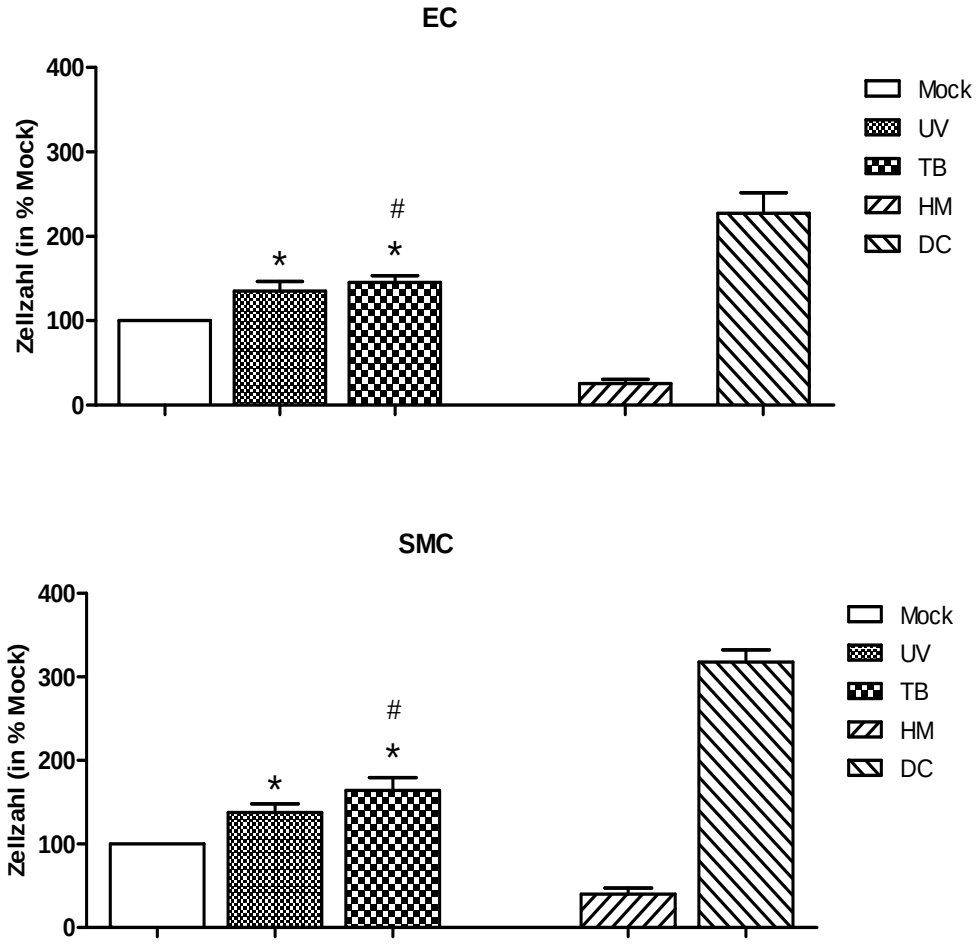


Abb. 6 Anzahl überlebender Monozyten nach siebentägiger Inkubation mit verschiedenen Überständen (ohne Viruszugabe behandelt [**Mock**], mit Ultraviolettlicht inaktiviertem Virus behandelt [**UVia**], mit infektiösem Virus behandelt [**TB**]) von **Endothelzellen (EC)** und **glatten Muskelzellen (SMC),** bzw. Inkubation mit **Hungermedium (HM),** bwz. Anzahl überlebender **Dendritischer Zellen (DC)** angegeben in Prozent der Kondition Mock, Mittelwerte mit Standardfehler von jeweils n=8 Spendern, ∗ für signifikant gegenüber Kondition Mock, # für signifikant gegenüber Kondition UV, signifikant = $p < 0,05$.

Die geringsten Überlebensraten zeigten sich bei den Monozyten, die lediglich mit unkonditioniertem Hungermedium (HM) inkubiert wurden (s. Abb. 6). Für die Kondition EC-HM ergaben sich Raten von durchschnittlich 25% Überlebenden im Vergleich zur Kondition Mock, für SMC-HM waren die Raten bei circa 40%. Die meisten Überlebenden gab es bei den zu DC differenzierten Zellen, hier fanden sich Überlebensraten von 230% bis 320% im Vergleich zu Mock-inkubierten.

Bei den mit konditionierten Medien inkubierten Monozyten verhielten sich die Überlebensraten bei den Überständen von Endothelzellen und glatten Muskelzellen ähnlich. Bei der Kondition UVia gab es signifikant ($p<0,05$ im Paired t-Test, GraphPad Prism 5) mehr überlebende Monozyten im Vergleich zu Mock (EC-UVia: 135%, $p=0,0258$, bzw. SMC-UVia: 138%, $p=0,0089$). Ebenso überlebten mehr Zellen der Kondition TB als bei Mock (EC-TB: 145%, $p=0,0009$, bzw. SMC-TB: 164%, $p=0,0042$). Im Vergleich zwischen den Konditionen UVia und TB gab es nur bei den mit Überständen von EC inkubierten Monozyten signifikant mehr Überlebende ($p=0,0091$), bei den Überständen von SMC war der Unterschied nicht signifikant ($p=0,1279$).

3.3 Messung der Proliferationsaktivität

Nach dem Ernten und Zählen der inkubierten Monozyten wurde mittels MTS-Assay die Aktivität mitochondrialer Enzyme bestimmt. Wegen zu wenig überlebender Zellen, konnte dieser Test nicht mit der Kondition Hungermedium-inkubierter Monozyten durchgeführt werden. Die Ergebnisse für die anderen Konditionen sind nachfolgend als Grafik dargestellt.

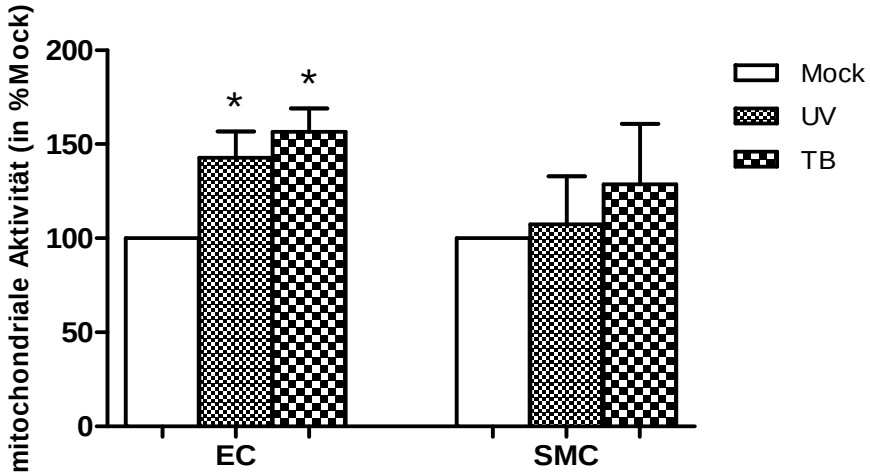


Abb. 7 Proliferationsaktivität der Monozyten nach Inkubation mit Überständen von verschiedenen (ohne Viruszugabe behandelt [**Mock**], mit Ultraviolettlicht inaktiviertem Virus behandelt [**UVia**], mit infektiösem Virus behandelt [**TB**]) **Endothelzellen (EC)** und **glatten Muskelzellen (SMC)**, angegeben in Prozent der Kondition Mock, Mittelwerte mit Standardfehler von n=5 Spendern (EC), bzw. n=3 Spendern (SMC), ∗ für signifikant gegenüber Kondition Mock, signifikant = $p < 0,05$.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse wiederum in Prozent der Kondition Mock umgerechnet (Mock=100%). Die entsprechenden Konditionen der mit Überständen von EC und SMC inkubierten Zellen verhielten sich ähnlich im Bezug auf ihre Proliferationsaktivität. Die mit Überständen von uninfizierten EC und SMC behandelten Monozyten zeigten dabei die geringste Aktivität (s. Abb. 7). Bei den EC-Überständen war die Aktivität sowohl bei der Kondition UVia, wie auch bei der Kondition TB im Vergleich zu Mock signifikant erhöht (EC-UVia: 143%, p=0,0367, bzw. EC-TB: 157%, p=0,0107). Die Erhöhung der Aktivität bei den SMC-Überständen war nicht signifikant (SMC-UVia: 107%, p=0,8012, bzw. SMC-TB: 129%, p=0,4681). Der Unterschied zwischen den Konditionen UVia und TB war weder bei den mit EC-, noch mit SMC-Überständen behandelten Monozyten signifikant (p=0,4607, bzw. p=0,3122). Die mitochondriale Aktivität der Dendritischen Zellen lag im Schnitt zwischen den Werten der Konditionen UVia und TB (124%, bzw. 145%, Daten nicht gezeigt).

3.4 Spontanmigration der inkubierten Monozyten gegen RPMI-Medium

Die ungerichtete Spontanmigration (Chemokinese) der inkubierten Monozyten wurde mit dem Boydenchamber-Assay untersucht. Dabei wurde die Anzahl an Zellen, die nach 1,5

Stunden durch eine Membran mit Porengröße von 5µm gegen RPMI-Medium mit 1%FCS migrierten, miteinander verglichen. Folgende Abbildungen zeigen die Ergebnisse des Assay als Mittelwert mit Standardfehler.

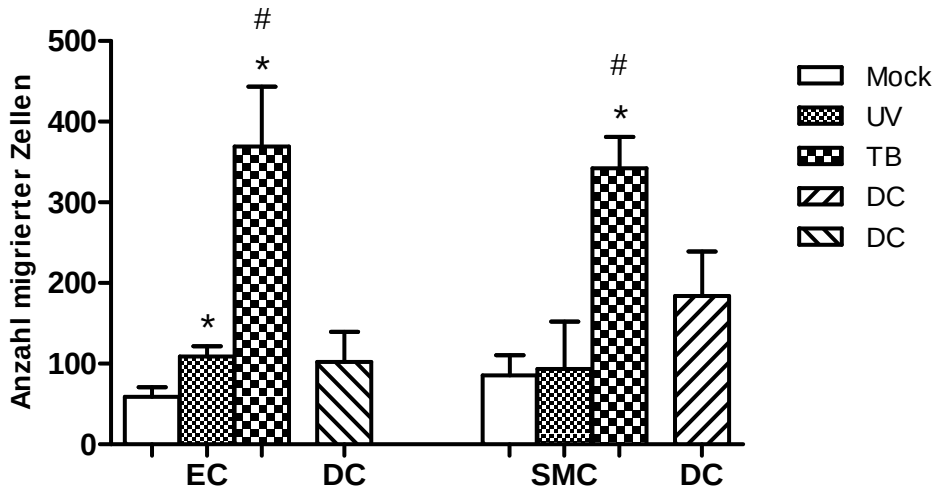


Abb. 8 Anzahl migrierter Zellen (5 Gesichtsfelder) nach Inkubation mit verschiedenen Überständen (ohne Viruszugabe behandelt [**Mock**], mit Ultraviolettlicht inaktiviertem Virus behandelt [**UVia**], mit infektiösem Virus behandelt [**TB**]) von **Endothelzellen (EC)** und **glatten Muskelzellen (SMC)**, bzw. Migration von **Dendritischen Zellen (DC)**, Mittelwerte mit Standardfehler von jeweils n=3 Spendern, ∗ für signifikant gegenüber Kondition Mock, # für signifikant gegenüber Kondition UV, signifikant = $p < 0,05$.

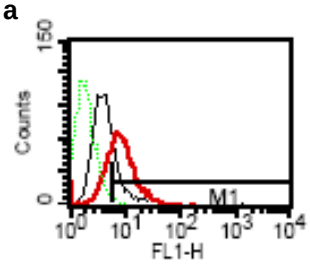
Die Monozyten, die mit Überständen von nicht-infizierten EC und SMC inkubiert wurden (Mock), zeigten die geringste Migrationsrate (59, bzw. 86 Zellen pro Auszählung, s. Abb. 8). Eine höhere Spontanmigration zeigten die Zellen der Kondition UVia, wobei der Unterschied zwischen Mock und UVia bei den EC-Überständen signifikant war (EC-UVia: 109 Zellen pro Auszählung, p=0,0477), bei den SMC-Überständen nicht (SMC-UVia: 93 Zellen pro Auszählung, p=0,9085). Die mit Abstand höchste Spontanmigration zeigten die Monozyten, die mit Überständen von TB-infizierten Endotelzellen und glatten Muskelzellen inkubiert wurden. Die Unterschiede im Vergleich der Konditionen Mock und TB waren jeweils signifikant (EC-TB: 369 Zellen pro Auszählung, p=0,0144, bzw. SMC-TB: 342 Zellen pro Auszählung, p=0,0053). Die Migrationsrate der Dendritischen Zellen lag mit durchschnittlich 102, bzw. 184 Zellen pro Auszählung zwischen der der Konditionen UVia und TB von EC- und SMC-Überständen.

3.5 Charakterisierung der inkubierten Monozyten nach Oberflächenmerkmalen

Nach siebentägiger Inkubation der Monozyten mit den verschiedenen konditionierten Medien sollten diese Zellen mittels Durchflußzytometrie bezüglich der Expression von Oberflächenmolekülen untersucht werden.
Bei den Versuchen war keine signifikante Tendenz zur Erhöhung oder Verminderung bestimmter Oberflächenmoleküle im Vergleich zwischen den Konditionen erkennbar. Lediglich die kostimulatorischen Marker CD80 und CD86, sowie HLA-ABC und HLA-DR waren bei den mit Überständen von TB40E-infizierten EC (s. Abb. 10) und SMC (s. Abb. 11) inkubierten Monozyten im Vergleich zu mit Überständen von uninfizierten Zellen inkubierten häufiger exprimiert. Bei den Differenzierungsmarkern CD14 und CD1a, dem FC-Rezeptor CD16, den Scavenger-Rezeptoren CD 36 und CD163, den Mannose-Rezeptoren CD206 und CD147, sowie dem Reifungsmarker CD83 waren die Ergebnisse zwischen den einzelnen Spendern sehr inhomogen.

Hier einige beispielhafte Darstellungen von Messergebnissen (Abb. 9) und die Ergebnisse für die verschieden inkubierten Monozyten als mittlere Fluoreszenzemmision (Abb. 10 und 11):

a



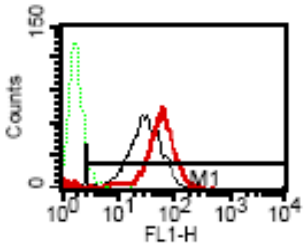
Sample ID: Mock CD80 CD86

Marker	Events	% Total	Mean	Geo Mean	Median
All	9221	92.21	6.23	4.48	4.22
M1	2042	20.42	14.59	8.63	7.30

Sample ID: Tb CD86 CD80

Marker	Events	% Total	Mean	Geo Mean	Median
All	7156	71.56	9.18	7.75	7.57
M1	5127	51.27	11.10	9.94	9.06

b



Sample ID: 17.6. Mock CD86 CD80

Marker	Events	% Total	Mean	Geo Mean	Median
All	8005	80.05	35.56	28.19	29.69
M1	7894	78.94	36.04	29.38	29.69

Sample ID: 17.6. TB CD86 CD80

Marker	Events	% Total	Mean	Geo Mean	Median
All	7288	72.88	60.23	48.05	54.25
M1	7101	71.01	61.77	52.61	55.23

Abb. 9 Beispielhafte Darstellung der Messergebnisse für den Marker CD86 mittels Durchflußzytometrie, Messwerte (rechts) und Grafiken (links): Monozyten, die mit Überständen von Virus-infizierten (TB) **Endothelzellen** (**EC)** (a), bzw. **glatten Muskelzellen (SMC)** (b) inkubiert wurden (TB; rote, dick gezeichnete Kurven), im Vergleich zu Monozyten, die mit Überständen von nicht-infizierten Zellen (Mock) inkubiert wurden (Mock; schwarze, dünn gezeichnete Kurven), und zum Kontrollantikörper (grüne, gestrichelte Kurven).

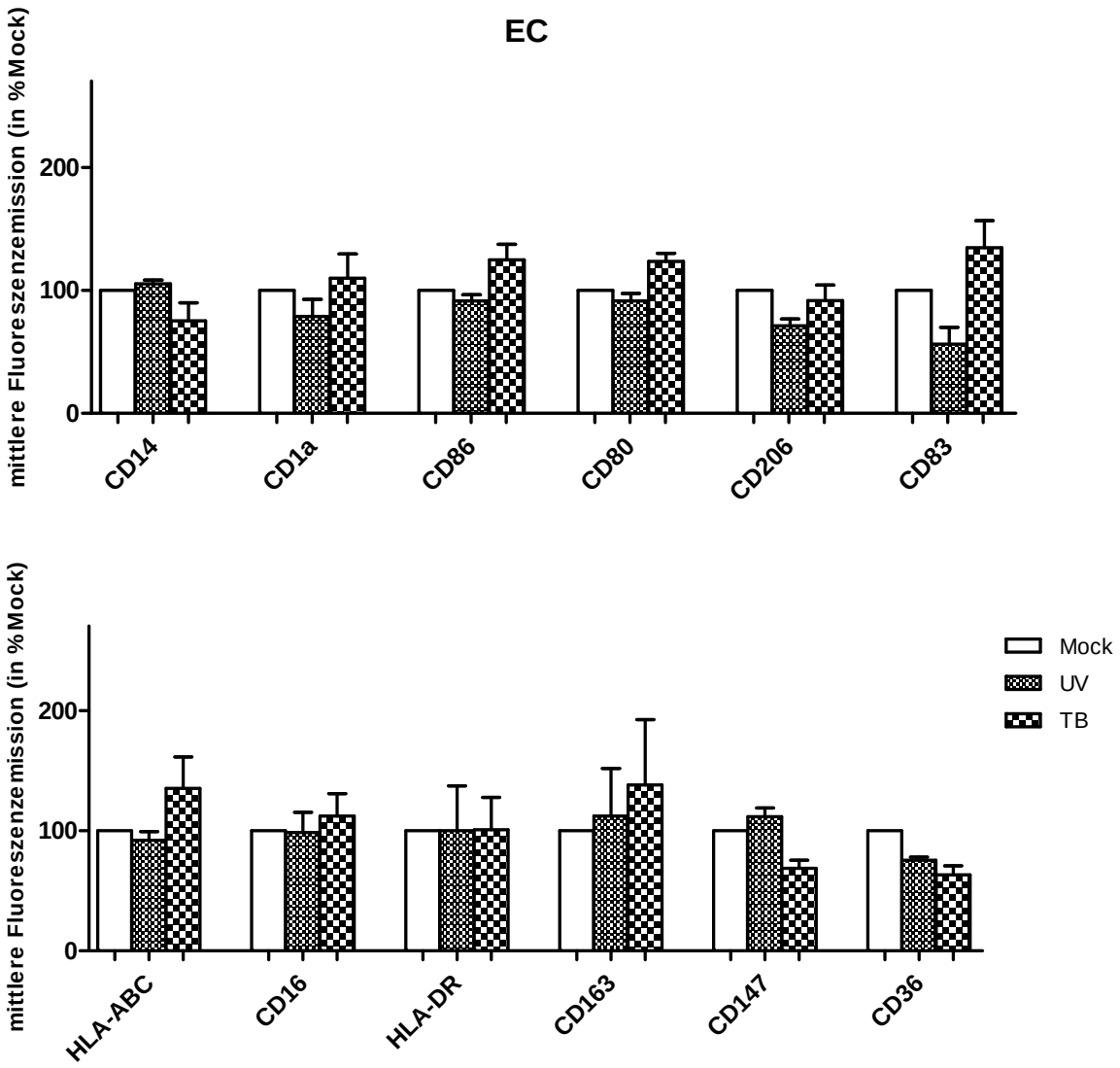


Abb. 10 Ergebnisse für die verschiedenen Marker (s. Tab. 1, S.21) bei mit Überständen (ohne Viruszugabe behandelt [**Mock**], mit Ultraviolettlicht inaktiviertem Virus behandelt [**UVia**], mit infektiösem Virus behandelt [**TB**]) von **Endothelzellen (EC)** inkubierten Monozyten als mittlere Fluoreszenzemmission in Prozent von Mock, von n=6 Spendern.

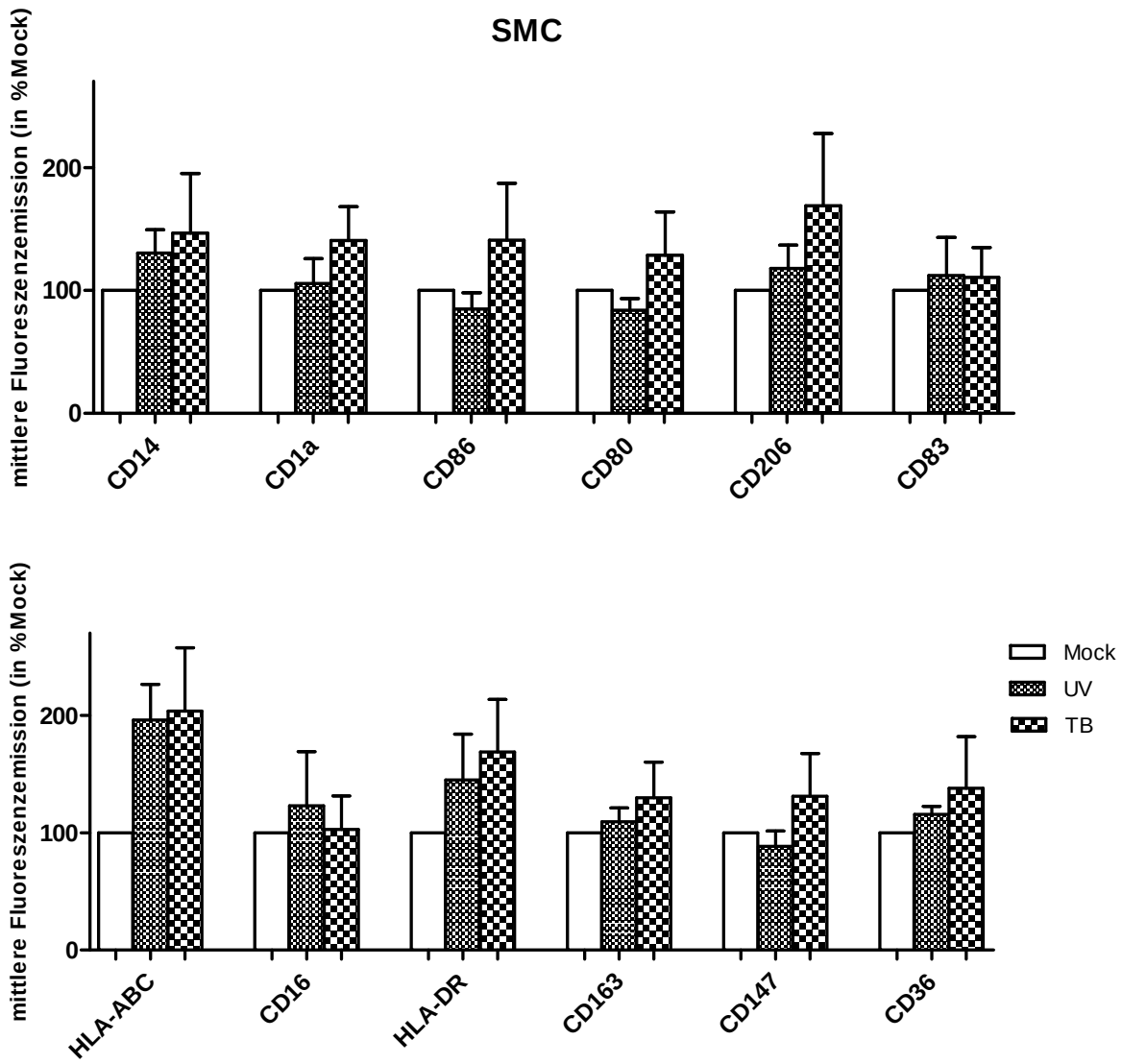


Abb. 11 Ergebnisse für die verschiedenen Marker (s. Tab. 1, S.21) bei mit Überständen (ohne Viruszugabe behandelt [**Mock**], mit Ultraviolettlicht inaktiviertem Virus behandelt [**UVia**], mit infektiösem Virus behandelt [**TB**]) von **glatten Muskelzellen (SMC)** inkubierten Monozyten als mittlere Fluoreszenzemmission in Prozent von Mock, von n=5 Spendern.

3.6 Bestimmung löslicher Moleküle in den konditionierten Medien

Die Untersuchung der konditionierten Überstände von Endothelzellen und glatten Muskelzellen auf das Vorhandensein bestimmter löslicher Moleküle erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung klinische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr.

M. Bachem. Dabei sollte die Konzentration folgender Stoffe ermittelt werden: G-CSF und GM-CSF, TNF-alpha, VEGF und FGF, MCP-1, IL-6, und -10. In den folgenden Grafiken sind die Ergebnisse der Arrays umgerechnet in Prozent der Kondition Mock für die Überstände von Endothelzellen und glatten Muskelzellen dargestellt (Mock=100%):

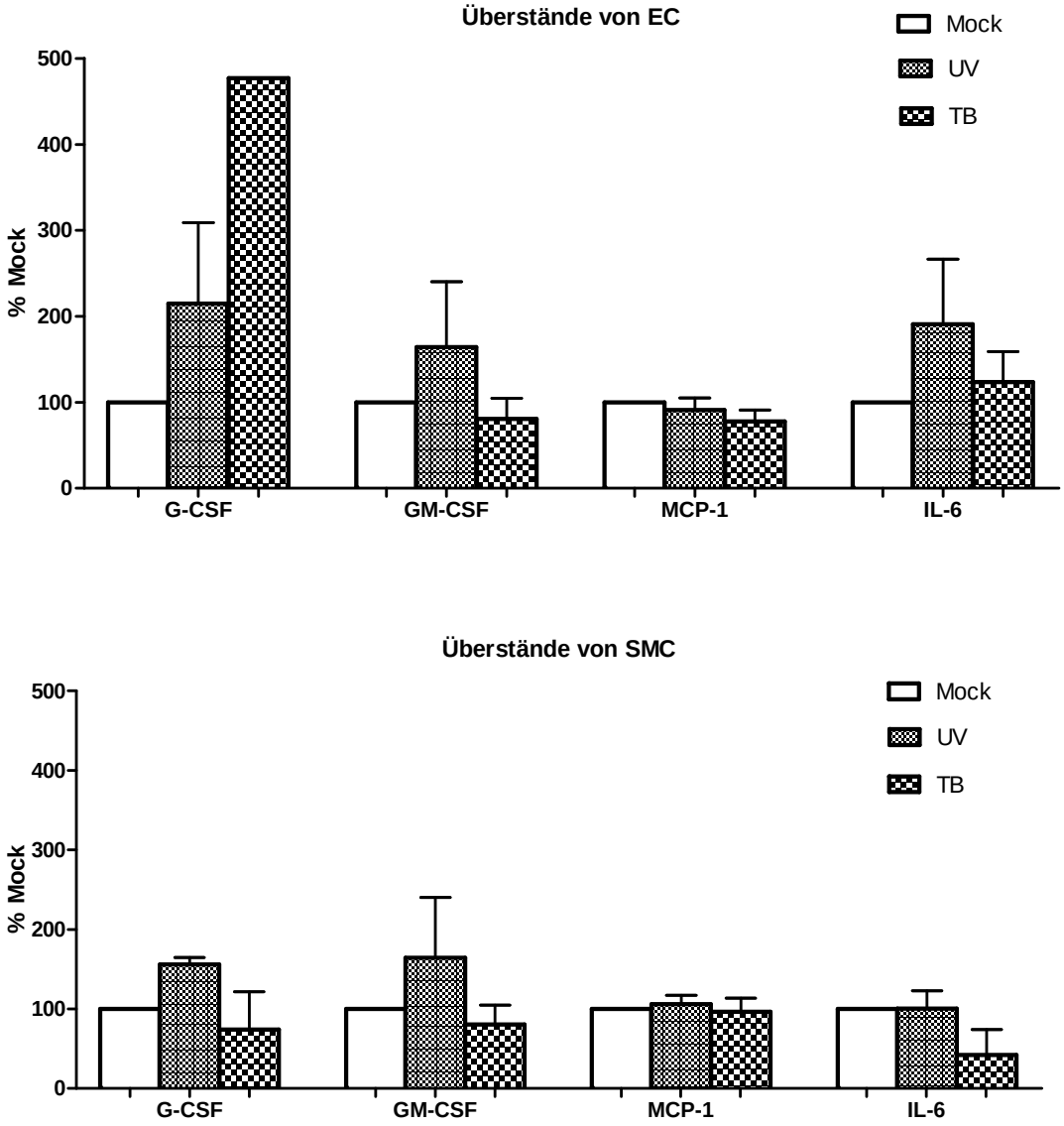


Abb. 12 Menge löslicher Moleküle (s. Tab.2, S22/23) in den verschiedenen konditionierten Medien (ohne Viruszugabe behandelt [**Mock**], mit Ultraviolettlicht inaktiviertem Virus behandelt [**UVia**], mit infektiösem Virus behandelt [**TB**]) von **Endothelzellen (EC)** und **glatten Muskelzellen (SMC)**, Mittelwerte mit Standardfehler von jeweils n=3 Spendern.

Der Wachstumsfaktor G-CSF war bei den mit UV-inaktiviertem Virus inkubierten Überständen und vor allem bei den Überständen von TB40E-infizierten Endothelzellen stark erhöht im Vergleich zu Mock behandelten (EC-UVia: 214,7%, EC-TB: 477,0%, s.

Abb. 12). Bei den Überständen der glatten Muskelzellen verhielt es sich umgekehrt, G-CSF war bei den TB-infizierten Zellen erniedrigt (SMC-TB: 74%). Für IL-6 fanden sich erhöhte Mengen in den TB-infizierten Überständen im Vergleich zu Mock-Überständen bei den Endothelzellen. Erniedrigte Mengen im Vergleich zu Mock fanden sich für IL-6 bei den glatten Muskelzellen. Unveränderte Werte gab es bei den Faktoren MCP-1 und GM-CSF bei Endothelzellen und glatten Muskelzellen.
Die Ergebnisse für TNF-alpha, VEGF, FGF, IL-8 und IL-10 waren zwischen den einzelnen Messungen sehr inhomogen.

3.7 Gerichtete Migration frisch isolierter Monozyten gegen konditionierte Medien

Um die konditionierten Überstände bezüglich ihres Effekts auf andere Zellen genauer zu beschreiben, wurde ein weiterer Boydenchamber-Assay durchgeführt. Hierbei migrierten frisch isolierte, undifferenzierte Monozyten vom oberen Kompartiment der Kammer gegen die verschiedenen konditionierten Medien. Im Folgenden sind die Ergebnisse des Assays grafisch dargestellt:

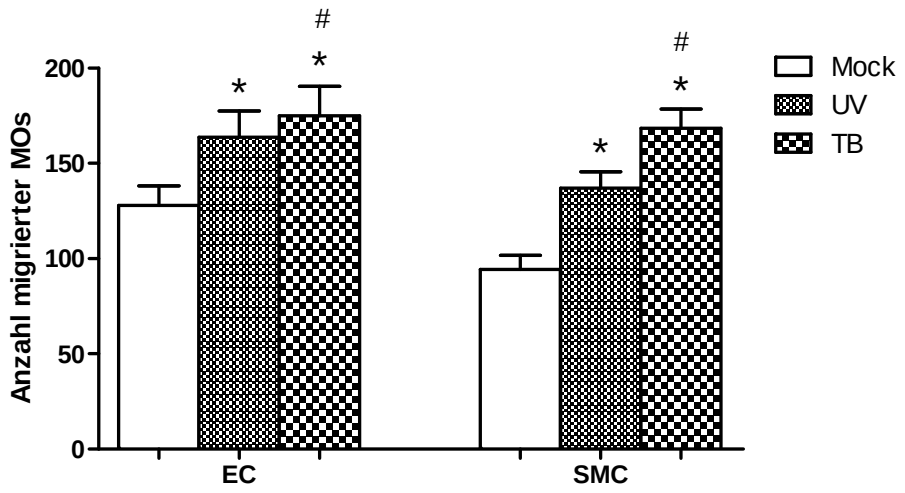


Abb. 13 Anzahl migrierter Monozyten (5 Gesichtsfelder) gegen verschieden konditionierte Überstände (ohne Viruszugabe behandelt [**Mock**], mit Ultraviolettlicht inaktiviertem Virus behandelt [**UVia**], mit infektiösem Virus behandelt [**TB**]) von **Endothelzellen (EC)** und **glatten Muskelzellen (SMC)**, Mittelwerte mit Standardfehler von jeweils n=3 Spendern, * für signifikant gegenüber Kondition Mock, # für signifikant gegenüber Kondition UV, signifikant = $p < 0,05$.

Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Migrationsrate gegen Überstände von Gefäßwandzellen mit Kontakt zu uninfektiösen viralen Partikeln (EC UV: 163,7 Monozyten = MOs pro Auszählung, p=0,0062, SMC UV: 137 MOs pro Auszählung, p=0,0282) im Vergleich zu Mock-behandelten (EC Mock: 127,8 MOs pro Auszählung, SMC Mock: 94,3 MOs pro Auszählung, s. Abb.10). Noch höher war die Migrationsrate gegen Überstände von HCMV-infizierten Endothel- und glatten Muskelzellen (EC TB: 175 MOs pro Auszählung, SMC TB: 168,5 MOs pro Auszählung). Dabei waren die Unterschiede zwischen den Konditionen Mock und TB, sowie zwischen UV und TB jeweils signifikant (EC: p=0,0025, bzw. p=0,0282, SMC: p=0,0021, bzw. p=0,0063).

4. Diskussion

Zytomegalieviren kommen bei einer Vielzahl von Säugetieren vor, die einzelnen Unterarten sind jeweils streng speziesspezifisch. Häufig bleibt eine Infektion immunkompetenter Individuen klinisch asymptomatisch oder symptomarm. Allerdings geht das Virus nach der Primärinfektion in ein latentes Stadium über, in dem es lebenslang im Organismus persistiert (38). Unter bestimmten Einflüssen, oft im Zusammenhang mit einer Schwächung des Immunsystems, kann es aus dieser Latenz reaktiviert werden und zu Erkrankungen unterschiedlicher Symptomatik und Schwere führen.

Der Zytomegalievirus-Infektion wird zunehmend auch eine krankheitsverursachende Rolle bei Immungesunden zugeschrieben. Neben weiteren exogenen und endogenen Faktoren ist das Virus möglicherweise an der Entstehung entzündlich-proliferativer Erkrankungen, wie der Atherosklerose, oder Autoimmunerkrankungen (27, 28, 43, 47, 48, 54, 55) beteiligt.

Arterielle Gefäßwandzellen, vornehmlich Endothelzellen und glatte Muskelzellen, sowie die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems sind in vivo und in vitro Zielzellen der Infektion durch das humane Zytomegalievirus.

Aufgrund der Verwendung verschiedener Methoden, sowie Virus- und Zelllinien, sind in der bisher veröffentlichten Literatur zum Teil widersprüchliche Ergebnisse zu finden. Beispielsweise zeigten die Monozyten der schwedischen Arbeitsgruppe um Gredmark und Söderberg-Naucler eine veränderte Infizierbarkeit mit einem fibroblasten-adaptierten HCMV-Stamm (14, 16), wohingegen monozytäre Zellen und Endothelzellen allgemein als nicht-infizierbar mit diesen Stämmen gelten (39). In der vorliegenden Arbeit wurde der endotheliotrope Stamm TB40E verwendet, mit dem sowohl Gefäßwandzellen als auch monozytäre Zellen gut infizierbar sind. Gredmark et al. (15) zeigten auch im Gegensatz zu Reinhardt et al. (33) eine HCMV-induzierte Reduktion des PDGFR-β auf infizierten SMC. Möglicherweise ist dieser Unterschied dadurch zu erklären, dass die Gruppe um Gredmark SMC nach häufigeren Passagierungen (bis Passage 14) benutzte, während durch Reinhardt et al. und in dieser Arbeit bewusst niedrige Passagen (bis max. Passage 6) verwendet wurden, um einem Verlust der Differenzierung dieser primären Zellen vorzubeugen.

Die Gruppe um Smith (41) beobachtete bei HCMV-infizierten Monozyten eine Zunahme der transendothelialen Migration, dagegen konnten Frascaroli et al. (10) und Gredmark et al. (16) eine Reduktion der chemokin-vermittelten Migration zeigen. Diese abweichenden Befunde können dadurch erklärt werden, dass die Gewinnung der Monozyten durch die Arbeitsgruppe von Smith durch Adhärenz an Kollagen, bzw. Fibronektin nach

Gradientenaufreinigung erfolgte, während die Monozyten von Frascaroli et al. und in der vorliegenden Arbeit durch Säulenaufreinigung mittels Negativselektion gewonnen wurden. Dadurch wird eine vorzeitige Aktivierung der Zellen durch das Aufreinigungsverfahren verhindert.

Die Arbeitsgruppe um Gredmark (16) untersuchte den Einfluss der HCMV-Infektion von Monozyten auf die Differenzierung in Makrophagen. Sie konnten zeigen, dass eine Infektion mit HCMV die zytokin-induzierte Differenzierung von Monozyten in Makrophagen blockiert. Im Vergleich zu Mock-behandelten Monozyten war bei den HCMV-infizierten Monozyten die Expression von HLA-II-Molekülen und CD86 erhöht, CD14 und HLA-I-Moleküle waren erniedrigt. Unsere Daten bestätigen diese Ergebnisse teilweise. Einerseits fand sich, wie publiziert, eine gesteigerte Expression von CD86 und CD80 (s. Abb.10 und 11), andererseits waren unsere Ergebnisse bezüglich der Expression von HLA-I genau gegensätzlich (s. Abb. 10 und 11). Die chemokin-vermittelte Migrationsfähigkeit der infizierten Zellen war bei Gredmark et al. vermindert, dieser Effekt war nicht abhängig von der Replikationsfähigkeit des Virus und konnte auch durch parakrine Faktoren von anderen, infizierten Monozyten ausgelöst werden. Vorliegende Arbeit zeigt ebenfalls die Beeinflussung der Monozyten auf parakrinem Weg, abhängig von der viralen Replikationsfähigkeit (vgl. Abb.8). Die Unterschiede erklären sich höchstwahrscheinlich durch deutlich unterschiedliche Versuchsbedingungen. Unter anderem verwendete die Arbeitsgruppe für diese parakrinen Versuche Monozyten-haltige PBMC-Kulturen und fibroblasten-adaptierte HCMV-Laborstämme (AD169 und Towne). Die Ergebnisse lassen sich daher nur bedingt mit denen dieser Arbeit vergleichen (s. auch Diskussion der Methodik). Als mögliche verantwortliche Faktoren in den Kulturüberständen fanden sie IFN-α, IL-6 und IL-10. Erhöhte Konzentrationen von IL-6 konnten auch in den Endothelzellüberständen in dieser Arbeit gemessen werden (s. Abb. 12, EC).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Gredmark et al. fand Smith mit seiner Arbeitsgruppe eine Förderung der Differenzierung von HCMV-infizierten Monozyten zu Makrophagen (41). Dieser Unterschied ist eventuell durch die Verwendung von Kollagen-beschichteten Kulturplatten statt Platten mit niedriger Adhärenzmöglichkeit zu erklären (s. Methodik).

Die Arbeitsgruppen von Dr. Giada Frascaroli und Dr. Barbara Reinhardt der Abteilung Virologie der Universität Ulm, konnten in den oben genannten Zellpopulationen potentiell

proatherogene Pathomechanismen identifizieren (9, 10, 33, 34, 35). So konnte bereits in Vorversuchen reproduzierbar gezeigt werden, dass nicht-infizierte Monozyten nach Inkubation mit konditionierten Medien von HCMV-infizierten Endothelzellen morphologisch einen veränderten Phänotyp aufweisen gegenüber konventionell differenzierten M1- und M2-Makrophagen.

4.1 Veränderte Kulturmorphologie

In den vorliegenden Versuchen fanden sich schon im Erscheinungsbild der Monozytenkulturen erhebliche Unterschiede. Als Zeichen für eine Aktivierung und mit steigendem Grad der Differenzierung scheinen die inkubierten Monozyten zunehmend zu aggregieren. Dabei neigten die voll differenzierten und mit LPS stimulierten Dendritischen Zellen am stärksten zur Bildung von Zellaggregaten. Ähnlich verhielten sich die Monozyten, die mit Überständen von infizierten Gefäßwandzellen inkubiert wurden. Der beobachtete Effekt scheint abhängig von der aktiven Replikationsfähigkeit des Virus zu sein, da der alleinige Kontakt mit uninfektiösen viralen Partikeln nur zu geringer Aggregation führte. Es liegt nahe, dass durch die aktive Infektion mit Modulation der Wirtszellgenexpression vermehrt lösliche Moleküle in den Kulturüberstand sezerniert werden, die eine gesteigerte Aktivierung und Differenzierung der inkubierten Monozyten bewirken.
Verantwortlich für die vermehrte Aggregation könnte beispielsweise die vermehrte Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) sein. Die Arbeitsgruppe um Burns (3) fand eine Erhöhung von ICAM-1 auf HCMV-infizierten HUVEC durch direkten Effekt der viralen IE-Proteine, und nicht über zelluläre Zytokinproduktion. Lautenschlager et al. (20) fanden in einer klinischen Studie an Lebertransplantierten eine erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in Biopsien von HCMV-infizierten Lebertransplantaten.

4.2 Erhöhte Überlebensrate

Neben der Aktivierung bieten die sezernierten Stoffe einen Überlebensstimulus für die Monozyten. Die höchste Überlebensrate zeigte sich bei den Dendritischen Zellen, wobei

die hier zur Differenzierung aus Monozyten nötigen, zugefügten Wachstumsfaktoren einen starken Stimulus darstellen. Dagegen gehen Monozyten, die nicht mit Wachstumsfaktoren oder anderen stimulierenden Faktoren in Kontakt kommen, innerhalb weniger Tage zugrunde (Hungermedium-Ansatz, s. Abb. 6). Dies geschieht auch physiologischerweise im menschlichen Körper. In den Überständen von infizierten Gefäßwandzellen lassen sich daher Stoffe vermuten, die einen Überlebensstimulus für die Monozyten darstellen. Hierbei scheint erneut die aktive Replikationsfähigkeit des Virus wichtig. In der vorliegenden Arbeit kommen als Überlebensstimuli am ehesten die erhöhten Mengen von G-CSF und IL-6, sowie evtl. GM-CSF, in den konditionierten Medien in Betracht (s. Abb. 12).
Die Verhinderung der Apoptose von infizierten Zellen ist ein mittlerweile gut untersuchter Mechanismus, mit der HCMV die menschliche Immunantwort beeinflusst (28). Durch den programmierten Zelltod in der frühen Phase der Infektion soll die Virusreplikation und Verbreitung im Körper verhindert werden (1). HCMV kodiert für verschiedene Genprodukte, die in Endothelzellen und glatten Muskelzellen die Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges blockieren (26). Ob ähnlich dieses Mechanismus auch parakrine Wirkungen auf die Apoptose anderer (Immun-)Zellen ausgeübt werden oder die erhöhte Überlebensrate ein Begleitphänomen der allgemeinen Entzündungssituation darstellt, bleibt derzeit unklar.

4.3 Gesteigerte Proliferationsaktivität

Ein weiteres Kriterium den Einfluss von HCMV auf die inkubierten Monozyten zu charakterisieren, war das Erfassen ihrer Proliferationsaktivität. Es zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung der Aktivität mitochondrialer Enzyme bei Inkubation der Monozyten mit Medien von infizierten Gefäßwandzellen im Vergleich zu Mock-behandelten Zellen. Der alleinige Kontakt mit inaktiviertem Virus hatte auf parakrinem Wege nur einen geringen Effekt auf die mitochondriale Aktivität. Das bedeutet, virale Genexpression ist nötig, um die Produktion und Freisetzung löslicher Faktoren zu stimulieren. Die Unterschiede in den Ergebnissen waren nur bei Überständen von Endothelzellen signifikant, da es zum Teil starke Schwankungen in den Messwerten zwischen den einzelnen Spendern gab. Dieses Phänomen ist durchaus bekannt beim Arbeiten mit primären Zellen (s. auch 9, 10).
Die HCMV-Infektion von vaskulären glatten Muskelzellen führt in den infizierten Zellen direkt zu einer gesteigerten Expression von funktionellem PDGF(=platelet derived growth

factor)β-Rezeptor (33). Die Stimulation dieses Rezeptors führt bei den glatten Muskelzellen zu einer gesteigerten Proliferationsaktivität. Dies ist ein möglicher Pathomechanismus bei der Atherogenese und Restenosierung durch die Bildung einer Neointima innerhalb der Gefäßwand. Eine parakrine, indirekte Wirkung, beispielsweise über die Zytokine IL-6 und IL-8, auf andere nicht-infizierte, bystander-SMC ist bisher nicht publiziert. Es existieren aber Daten, dass es zu einer gesteigerten Migration dieser Zellen kommt (persönliche Kommunikation mit Dr. Barbara Reinhardt, Abteilung Virologie Universität Ulm, s. auch 57). In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass parakrine Effekte auf die Proliferation weiterer Zelltypen in der Gefäßwand (hier Monozyten) durchaus möglich sind.
Die Stimulierung mitochondrialer Enzyme der inkubierten Monozyten spricht für eine erhöhte Stoffwechselaktivität, die der Vorbereitung auf eine mögliche Immunantwort dienen oder die Differenzierung in Makrophagen einleiten könnte.

4.4 Beeinflussung der Spontanmigration

In den Boydenchamber-Versuchen zeigte sich eine deutlich erhöhte Spontanmigration bei den Monozyten, die mit Überständen von infizierten im Vergleich zu Mock-behandelten Gefäßwandzellen inkubiert wurden (bei Überständen von EC ca. 6-fach, bei SMC ca. 4-fach, s. Abb. 8). Infizierte Endothelzellen senden Signale an Abwehrzellen, die dann vermehrt zum Ort der Infektion migrieren und möglicherweise eine Entzündungsreaktion unterstützen. Uninfektiöse, UV-inaktivierte virale Partikel erhöhten parakrin kaum die Migrationsrate der Monozyten.
Die Verminderung der Motilität von infizierten Immunzellen ist eine wichtige Strategie des Zytomegalievirus in der Unterdrückung der Wirtsimmunität. Die direkte Infektion von Monozyten mit endotheliotropen HCMV-Stämmen hemmt die gerichtete Migration dieser Zellen durch Herunterregulation der Expression verschiedener Chemokinrezeptoren an der Zelloberfläche (10). Bei direkter Infektion von Makrophagen wird die Motilität zusätzlich durch eine Reorganisation des Zytoskeletts und die Sekretion löslicher Inhibitoren, wie MIF (= macrophage migration inhibitory factor) eingeschränkt (9).
Dieser Effekt der Immunsuppression durch HCMV dient der Unterdrückung einer Immunantwort gegen das Virus und unterstützt die schnelle Verbreitung im Körper, wobei infizierte Monozyten selbst ein wichtiges Vehikel für diese Verbreitung sind. Nach

Differenzierung zu Makrophagen kann es erneut zur produktiven Virusvermehrung kommen (10). Der Effekt kann vorzugsweise bei der Primärinfektion oder Reaktivierung des Virus bei schwerer Immunsuppression beobachtet werden und kann das Risiko einer Infektion mit anderen bakteriellen Pathogenen oder Pilzen erhöhen (31).
In der Phase niedriger viraler Replikation, beispielsweise im Rahmen einer asymptomatischen Reaktivierung, könnte die Migration von Monozyten möglicherweise durch einen parakrinen Einfluss von infizierten Gefäßwandzellen in der Nachbarschaft deutlich gesteigert sein. Dies könnte zu einer verstärkten Einwanderung von entzündungsvermittelnden Zellen in den subintimalen Raum führen und somit zur Plaqueenstehung führen.

4.5 Beeinflussung der Expression von Oberflächenmerkmalen

Die aus Monozyten differenzierten Makrophagen können sich in zwei Hauptrichtungen polarisieren. Bei der sogenannten „klassischen“ Aktivierung mit IFN-γ und LPS entstehen M1-Makrophagen, die sich durch eine Typ-1-Entzündungsreaktion mit Gewebezerstörung, sowie Abtötung intrazellulärer Pathogene und Tumorzellen auszeichnen. Merkmale dieser proinflammatorischen M1-Makrophagen sind die Expression von Zytokinen wie TNF-α und IL-1, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffintermediaten, sowie CD86, CD16 und MHC-II (23, 24). Immunmodulatorische M2-Makrophagen differenzieren sich unter dem Einfluss von IL-4/IL-13, Glukokortikoiden und TGF-β und unterstützen eine Typ-2-Entzündungsreaktion mit Geweberemodelling, Angiogenese, Einkapselung von Parasiten und Tumorprogression (24). Sie exprimieren IL-10, sowie Scavenger- und Mannoserezeptoren.
In klinischen Studien mit Patienten, die an akutem Koronarsyndrom leiden, konnte ein Zusammenhang zwischen der atherosklerose-bedingten Erkrankung und dem Vorhandensein von HLA-DR als Marker für eine Immun-, bzw. Entzündungsaktivität, sowie CD86 als Marker für Makrophagenaktivierung festgestellt werden (21, 30, 45) In dieser Studie kamen die Methoden der Immunhistochemie (30) und FACS-Analyse (45) zum Einsatz.
In den hier vorliegenden FACS-Untersuchungen zeigte sich keine statistisch signifikante Hoch- oder Herunterregulation bestimmter charakteristischer Oberflächenmerkmale, da sich zwischen den Messergebnissen der unterschiedlichen Spender ausgeprägte

Schwankungen zeigten und damit keine einheitliche Tendenz festzumachen war. Dies ist ein bekanntes Phänomen bei primären Zellen (9, 10, 16). Jedoch konnte in dieser Studie meist eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie der MHC-Antigene HLA-ABC und HLA-DR beobachtet werden (Abb.10 und 11).

4.6 Ausschüttung löslicher Moleküle durch infizierte Gefäßwandzellen

Die Untersuchung der konditionierten Medien auf das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren und anderen stimulierenden Faktoren ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Konditionen. Es zeigte sich aber eine Tendenz zur vermehrten Ausschüttung von G-CSF, GM-CSF und IL-6 durch infizierte Endothelzellen (s. Abb. 12). Die erhöhte Sektetion von IL-6 nach Infektion mit HCMV ist bereits für humane Trophoblastenzellen (17) und lymphatische EC (8), sowie nach Transfektion von monozytären Zellen (THP-1) mit CMV-immediate early Genen (18) bekannt.
Die Konzentration einiger Faktoren zeigten wie bereits die Expression von Oberflächenmolekülen große interexperimentelle Schwankungen. Um potentielle funktionelle parakrine Veränderungen erfassen zu können wurden chemotaktische Migrationsversuche mit frisch isolierten, naiven Monozyten durchgeführt.

4.7 Attraktion frisch isolierter Monozyten durch konditionierte Medien

Mittels Boydenchamber-Assay wurde der Einfluss der konditionierten Medien auf die gerichtete, chemotaktisch bedingte Migration frisch isolierter Monozyten untersucht. Es zeigte sich, dass es bereits bei Kontakt von Gefäßwandzellen mit uninfektiösen viralen Partikeln zu einer signifikant gesteigerten Freisetzung von löslichen Faktoren kam, die zu einer Attraktion von naiven Monozyten führte. Bei einer aktiven Infektion der Endothelzellen und glatten Muskelzellen war der beobachtete, parakrine Effekt noch stärker (s. Abb. 13).
Die HCMV-Infektion von Endothelzellen führt neben der erhöhten Expression von Zelladhäsionsmolekülen (6, 3, 20, s. auch 4.1) zur Sekretion von verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, bzw. viralen Chemokinhomologen (49), wodurch Entzündungszellen rekrutiert werden. Beispielsweise wird durch die

Hochregulation der IL-8-Genexpression die transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten stimuliert (5).

In glatten Muskelzellen induziert die HCMV-Infektion die Expression von 5-Lipoxygenase (32). Dieses Enzym ist verantwortlich für die Synthese von Leukotrienen, pro-inflammatorischen Lipidmediatoren, die eine Rolle bei kardiovaskulären und chronisch-entzündlichen Erkrankungen spielen. Das hierbei gebildete Leukotrien LTB4 wirkt chemotaktisch und führt zur Infiltration und Aktivierung von Immunzellen. Außerdem stimuliert LTB4 die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und trägt so zur intimalen Hyperplasie bei (s. auch 4.3).

Das pro-inflammatorische Zytokin MCP-1 (= monocyte chemotactic protein 1) konnte verstärkt in Makrophagen-reichen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Die Freisetzung von MCP-1 in Plaques induziert möglicherweise die weitere Einwanderung von Monozyten/Makrophagen (4, 12, 47). Desweiteren stimuliert MCP-1 die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Sekretion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine (56).

Die Arbeitsgruppe um Reinhardt konnte weiterhin nachweisen, dass HCMV-infizierte Fibroblasten und SMC vermehrt VEGF (vascular endothelial growth factor) freisetzen (34). Zu diesem Effekt führte schon der alleinige Kontakt mit uninfektiösen viralen Partikeln. Daneben kam es auch zu einer gesteigerten Expression von VEGFR-2 auf Endothelzellen, die mit den VEGF-haltigen Überständen von HCMV-infizierten SMC inkubiert wurden. Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit keine durchgängig erhöhte VEGF-Sekretion detektiert werden, allerdings käme dieser Faktor durchaus als Chemoattraktans für die VEGF-Rezeptor-1 tragenden Monozyten in Frage (51).

Trotz fehlender Identifikation eines verantwortlichen Zytokins oder Faktors in den konditionierten Medien, ist die chemotaktische Eigenschaft der Medien auf Monozyten eindeutig. Der Effekt kann bedingt sein durch andere, nicht untersuchte Faktoren oder letztendlich durch das Zusammenspiel verschiedener Stoffe, wie es auch physiologischerweise oft der Fall ist.

Die vorliegende Arbeit konnte keine eindeutig richtungsweisende Antwort auf die Frage liefern, ob die HCMV-Infektion von Gefäßwandzellen die Polarisation von Monozyten in einen entzündungsvermittelnden M1-Phänotyp oder in einen immunregulatorischen M2-Phänotyp fördert. Physiologischerweise besteht ein fließender Übergang zwischen den beiden extremen Ausprägungsformen, der durchaus auch wieder reversibel ist. In

Zusammenschau aller Ergebnisse lässt sich eher eine HCMV-induzierte Modulation der Monozyten/Makrophagen in Richtung inflammatorischen Typ vermuten. Die veränderte Kulturmorphologie mit Bildung von großen Zellaggregaten, die höhere Überlebensrate und Proliferationsaktivität, sowie die gesteigerte Motilität sprechen für eine allgemeine Aktivierung der Zellen, im Sinne einer Veränderung in Richtung inflammatorischen Phänotyp. Auch die chemoattraktive Eigenschaft der konditionierten Medien, mit enthaltenen inflammatorischen Zytokinen (IL-6) spricht für die Induktion eines entzündlichen Geschehens.

Während eine Primärinfektion mit hoher HCMV-Last zu einer Immunsuppression führen kann (31), bedingt die fortwährende Replikation auf niedrigem Niveau eine systemische Immunaktivierung, die durch ein Typ-1-Zytokinmuster geprägt ist (53). Die HCMV-Infektion von Endothelzellen führt neben der direkten Schädigung durch lytischen Zelluntergang zur sogenannten endothelialen Dysfunktion durch verminderte Expression und Aktivität der NO-Synthase (37). Die endotheliale Dysfunktion ist neben der intimalen Lipidakkumulation einer der ersten Schritte in der Atherogenese. Durch die Hochregulation zellulärer Adhäsionsmoleküle (6) und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wird die Infiltration und Akkumulation von Entzündungszellen gefördert. Die Stimulation der Migration und Proliferation, sowie der Block der Apoptose in glatten Muskelzellen führt zu intimaler Hyperplasie und Gefäßverengung (19, 50, 57). Eine vermehrte Expression von VEGF durch infizierte SMC könnte Monozyten anlocken und eine Vaskularisation von atherosklerotischen Plaques bewirken. Dies könnte die Gefahr einer Plaqueruptur mit massiver Einblutung und plötzlichem Gefäßverschluss erhöhen (34). Ebenfalls könnte die Rupturgefahr durch HCMV-induzierte Reduktion von extrazellulären Matrixproteinen und einer damit verbundenen Schwächung der fibrösen Plaquekappe erhöht werden. In vitro Daten suggerieren, dass eine Reduktion sowohl durch eine virus-induzierte Synthesestörung als auch durch eine Steigerung des EZM-Abbaus durch die Matrixmetalloproteinase-2 bedingt sein könnte (35).

Damit steht das Zytomegalievirus im Verdacht potentiell kritische Schritte in der Atherogenese und der Vaskulopathie bei Transplantatabstoßung zu fördern. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Theorie der Beteiligung von HCMV an der Pathogenese entzündlich-proliferativer Erkrankungen, wobei infizierte Gefäßwandzellen wahrscheinlich zu einer parakrinen Attraktion von Entzündungszellen und damit zur Aufrechterhaltung des Entzündungsgeschehens führen können.

4.8 Diskussion der Methodik

Bei experimentellen Modellen ist es wichtig, Viren und Zielzellen zu verwenden, die auch in vivo relevant für die speziell untersuchten Pathomechanismen sind. Deswegen wurden für die vorliegenden Versuche ein humanes Zytomegalievirus-Isolat und humane koronare Gefäßzellen verwendet. Animale CMV-Stämme, bzw. Modelle mit tierischen Zellen können ein unterschiedliches biologisches Verhalten aufweisen und sind daher nur bedingt geeignet, um gewonnene Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen.

Für die Experimente wurden bewusst niedrig passagierte primäre Zellen (EC und SMC) bis maximal Passage 6 verwendet, um einen Verlust der Differenzierung dieser Zellen nach häufigen in-vitro-Passierungen zu verhindern.

Das gewählte HCMV-Isolat TB40E wird von vielen Forschungsinstituten weltweit als eines der „HCMV-Prototypisolate“ verwendet und weist große Ähnlichkeiten mit dem Wildtyp-Virus auf. „Klassische“ Laborstämme, wie AD169 und Towne, sind nicht-endotheliotrop und zeigen viele Deletionen gegenüber klinischen Virusisolaten (40, 57). Sie sind daher weniger gut geeignet, die Mechanismen der HCMV-bedingten Modulation der Genexpression in vitro zu untersuchen.

Der MOI für die Infektion der Gefäßwandzellen wurde so gewählt (MOI=10 für EC, MOI=1 für SMC), dass es zu einer ausreichenden Infektion der Zellen kam ohne eine artifizielle Aktivierung oder ein massives Absterben der Zellen durch eine unnatürlich hohe Viruslast herbei zu führen.

Die Infektion erfolgte weiterhin in serumarmem Hungermedium (nur 1% FCS). Damit wird das passive Einbringen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die im FCS enthalten sind, minimiert und eine unspezifische Aktivierung der Zellen so klein wie möglich gehalten.

Zur Gewinnung der Monozyten aus PBMC wurde die Methode der Säulenaufreinigung durch Negativselektion gewählt. Dadurch wurde eine unspezifische Aktivierung der Zellen durch das Aufreinigungsverfahren weitgehend vermieden. Versuche wie die FACS-Analysen zeigten aber große interindividuelle Unterschiede zwischen den Monozytenpopulationen der einzelnen Buffycoat-Spender. Da die Menge an gewonnenen Monozyten eines Spenders nur für ein bis zwei Versuchsansätze genügt, wurde für eine ausreichende Anzahl an Experimenten auf mehrere Spender zurückgegriffen.

5. Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine entzündlich-proliferative Erkrankung, charakterisiert durch die Akkumulation von Entzündungszellen, glatten Muskelzellen und Cholesterin in der Wand arterieller Gefäße mit Bildung sogenannter Plaques. Die Ruptur dieser Plaques kann zu klinischen Komplikationen, wie Angina pectoris, Myokardinfarkt, Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit führen. Obwohl die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von Atherosklerose führen, noch nicht komplett verstanden sind, so scheint das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Plaqueformation und der Entstehung von Komplikationen zu spielen. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass zahlreiche endogene und exogene Faktoren, unter anderem das humane Zytomegalievirus, an der Pathogenese der Atheroklerose beteiligt sein können. Erkenntnisse aus Tiermodellen und Ergebnisse aus verschiedenen epidemiologischen und klinischen Studien am Menschen erhärten diesen Verdacht. Das humane Zytomegalievirus etabliert nach Infektion eine lebenslange Latenz und besitzt die Fähigkeit, durch Modulation der Genexpression zelluläre und immunologische Funktionen im Wirtsorganismus zu beeinflussen. Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der Zytomegalievirusinfektion von humanen Gefäßwandzellen auf die Differenzierung und Aktivierung von Monozyten untersucht werden.

Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Infektion von Gefäßwandzellen auf parakrinem Weg die Polarisation der Monozyten in einen eher entzündungsvermittelnden oder in einen eher immunregulatorischen Phänotyp beeinflusst. Dazu wurden humane koronare Endothelzellen und glatte Muskelzellen mit dem humanen Zytomegalievirus infiziert, die Überstände der Zellen geerntet und von replikationsfähigen viralen Partikeln befreit. Durch Negativselektion gewonnene humane Monozyten wurden mit diesen konditionierten Überständen inkubiert und anschließend auf eine mögliche pro-atherogene Differenzierung hin untersucht. Schon in der Kulturmorphologie fiel ein Aktivierungszustand der inkubierten Monozyten mit Bildung von großen Zellaggregaten auf. Die Bestimmung der Zellzahlen zeigte eine höhere Überlebensrate und in Proliferationsassays war die Aktivität mitochondrialer Enzyme gesteigert. In Boydenchamber-Versuchen wiesen inkubierte Monozyten eine Erhöhung der Spontanmigration auf. Die Untersuchung von Oberflächenmerkmalen mittels Durchflußzytometrie lieferte keinen direkten Aufschluss über die Differenzierung in einen polarisierten Phänotyp. Bei der Quantifizierung löslicher Moleküle in den Überständen durch Multiplex-Suspension-Arrays war eine Erhöhung des

inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 zu beobachten. Migrationsversuche mit frisch isolierten Monozyten zeigten eine vermehrte chemotaktische Attraktion naiver Entzündungszellen durch die konditionierten Überstände.

Die vorliegende Arbeit konnte die Frage bezüglich der Polarisation der Monozyten in einen entzündungsvermittelnden oder in einen immunregulatorischen Phänotyp nicht eindeutig beantworten. Vieles spricht aber für die Induktion eines eher entzündlichen Gesamtgeschehens. Durch das Triggern einer chronischen Inflammation innerhalb der Gefäßwand ist das humane Zytomegalievirus möglicherweise an entscheidenden Schritten in der Pathogenese der Atherosklerose und der Entstehung atherosklerose-bedingter Komplikationen, wie der Plaqueruptur beteiligt. Die zukünftige Forschung auf diesem Gebiet wird zeigen, ob der Ansatz einer systemischen anti-inflammatorischen Therapie gegenüber den momentan etablierten lokalen, und damit begrenzten, Interventionsmöglichkeiten sinnvoll erscheint.

6. Literaturverzeichnis

1. **Andoniou CE, Degli-Esposti MA**. Insights into the mechanisms of CMV-mediated interference with cellular apoptosis. Immunol Cell Biol **2006**; 84: 99-106
2. **Britt W**. Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease. Curr Top Microbiol Immunol **2008**; 325: 418-470
3. **Burns LJ, Pooley JC, Walsh DJ, Vercellotti GM, Weber ML, Kovacs A**. Intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells is activated by cytomegalovirus immediate early proteins. Transplantation **1999**; 67: 137-144
4. **Charo IF, Taubman MB**. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. Circ Res **2004**; 95: 858–866
5. **Craigen JL, Young KL, Jordan NJ, MacCormac LP, Westwick J, Akbar AN, Grundy JE**. Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration. Immunology **1997**; 92: 138-145
6. **Dengler TJ, Raftery MJ, Werle M, Zimmermann R, Schonrich G**. Cytomegalovirus infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1beta. Transplantation **2000**; 69: 1160-1168
7. **Fairweather D, Cihakova D**. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. J Autoimmun **2009**; 33: 222-230
8. **Fiorentini S, Luganini A, Dell`Oste V, Lorusso B, Cervi E, Caccuri F, Bonardelli S, Landolfo S, Caruso A, Gribaudo G**. Human cytomegalovirus productively infects lymphatic endothelial cells and induces a secretome that promotes angiogenesis and lymphangiogenesis through interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Gen Virol **2011**; 92: 650-660
9. **Frascaroli G, Varani S, Blankenhorn N, Pretsch R, Bacher M, Leng I, Bucala R, Landini MP, Mertens T**. Human cytomegalovirus paralyzes macrophage motility through down-regulation of chemokine receptors, reorganization of the cytoskeleton, and release of macrophage migration inhibitory factor. J Immunol **2009**; 182: 477-488
10. **Frascaroli G, Varani S, Moepps B, Sinzger C, Landini MP, Mertens T**. Human cytomegalovirus subverts the functions of monocytes, impairing chemokine-mediated migration and leukocyte recruitment. J Virol **2006**; 80: 7578-7589

11. **Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ**. Atherothrombosis and high-risk plaque. J Am Coll Cardiol **2005**; 46: 937-954
12. **Gerard C, Rollins BJ**. Chemokines and disease. Nat Immunol **2001**; 2: 108–115
13. **Goldmacher VS**. Cell death suppression by cytomegalovirus. Apoptosis **2005**; 10: 251-265
14. **Gredmark S, Soderberg-Naucler C**. Human cytomegalovirus inhibits differentiation of monocytes into dendritic cells with the consequence of depressed immunological functions. J Virol **2003**; 77: 10943-10956
15. **Gredmark S, Straat K, Homman-Loudiyi M, Kannisto K, Soderberg-Naucler C.** Human cytomegalovirus downregulates expression of receptors for platelet-derived growth factor by smooth muscle cells. J Virol **2007**; 81: 5112-5120
16. **Gredmark S, Tilburgs T, Soderberg-Naucler C**. Human cytomegalovirus inhibits cytokine-induced macrophage differentiation. J Virol **2004**; 78: 10378-10389
17. **Halwachs-Baumann G, Weihrauch G, Gruber HJ, Desoye G, Sinzger C**. HCMV induced IL-6 release in trophoblast like cells. J Clin Virol **2006**; 37: 91-107
18. **Iwamoto GK, Konicek SA**. Cytomegalovirus immediate early genes upregulate interleukin-6 gene expression. J Investig Med **1997**; 45: 175-182
19. **Kotton CN**. Management of cytomegalovirus infection in solid organ translantation. Nat Rev Nephrol **2010**; 6: 711-721
20. **Lautenschlager I, Halme L, Höckerstedt K, Krogerus L, Taskinen E**. Cytomegalovirus infection of the liver transplant: virological, histological, immunological and clinical observations. Transpl Infect Dis **2006**; 8: 21-30
21. **Libby P**. Atherosclerosis: disease biology affecting the coronary vasculature. Am J Cardiol **2006**; 98: 3Q-9Q
22. **Loewendorf A, Benedict CA**. Modulation of host innate and adaptive immune defenses by cytomegalovirus: timing is everything. J Intern Med **2010**; 267: 483-501
23. **Mantovani A, Sica A, Locati M**. New vistas on macrophage differentiation and activation. Europ J Immunol **2007**; 37: 14-16
24. **Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M**. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol **2004**; 25: 677-686
25. **Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M**. Macrophage activation and polarization. Front Biosci **2008**; 13: 453-461

26. **McCormick AL**. Control of apoptosis by human cytomegalovirus. Curr Top Microbiol Immunol **2008**; 325: 281-295
27. **Milioti N, Bermudez-Fajardo A, Penichet ML, Oviedo-Orta E**. Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin Develop Immunol **2008**; 2008: Article ID 723539, 15 pages
28. **Miller-Kittrell M, Sparer TE**. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. Virol J **2009**; 6:4, 20 pages
29. **Mocarski ES, Shenk T, Pass R**. Cytomegalovirus. In: Fields Virology. Volume2. Fifth edition. Edited by Knipe D, Howley P. Lippincott Williams and Wilkins; **2007**: 2701-2772
30. **Neri Serneri G, Boddi M, Modesti PA, Cecioni I, Coppo M, Papa ML, Toscano T, Marullo A, Chavarelli M**. Immunmediated and ischemia-independent inflammation of coronary microvessels in unstable angina. Circ Res **2003**; 92: 1359-1366
31. **Nichols WG, Corey L, Gooley T**. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. J Infect Dis **2002**; 185: 273-282
32. **Qiu H, Straat K, Rahbar A, Wan M, Soderberg-Naucler C, Haeggström JZ**. Human CMV infection induses 5-lipoxygenase expression and leukotriene B4 production in vascular smooth muscle cells. J Exp Med **2008**; 205: 19-24
33. **Reinhardt B, Mertens T, Mayr-Beyrle U, Frank H, Luske A, Schierling K, Waltenberger J**. HCMV infection of human vascular smooth muscle cells leads to enhanced expression of functionally intact PDGF β-receptor. Cardiovasc Res **2005**; 67: 151-160
34. **Reinhardt B, Schaarschmidt P, Bossert A, Luske A, Finkenzeller G, Mertens T, Michel D**. Upregulation of functionally active vascular endothelial growth factor by human cytomegalovirus. J Gen Virol **2005**; 86: 23-30
35. **Reinhardt B, Winkler M, Schaarschmidt P, Pretsch R, Zhou S, Vaida B, Schmid-Kotsas A, Michel D, Walther P, Bachem M, Mertens T**. Human cytomegalovirus-induced reduction of extracellular matrix proteins in vascular smooth muscle cell cultures: a pahtomechanism in vasculopathies? J Gen Virol **2006**; 87: 2849-2858
36. **Ross R**. Atherosclerosis: an inflammatory disease. N Engl J Med **1999**; 340: 115-126
37. **Shen YH, Zhang L, Utama B, Wang J, Gan Y, Wang X, Wang J, Chen L, Vercellotti GM, Coselli JS**. Human cytomegalovirus inhibits Akt-mediated eNOS

activation through upregulation PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10). Cardiovasc Res **2006**; 69: 502-522

38. **Sinclair J, Sissons P**. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. J Gen Virol **2006**; 87: 1763-1779
39. **Sinzger C, Eberhardt K, Cavignac Y**. Macrophage cultures are susceptible to lytic productive infection by endothelial-cell-propagated human cytomegalovirus strains and present viral IE1 protein to CD4+ T cells despite late downregulation of MHC class II molecules. J Gen Virol **2006**; 87: 1853-1862
40. **Sinzger C, Schmidt K, Knapp J, Kahl M, Beck R, Waldman J, Hebart H, Einsele H, Jahn G**. Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome. J Gen Virol **1999**; 80: 2867-2877
41. **Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD**. Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. J Virol **2004**; 78: 4444-4453
42. **Soderberg-Naucler C**. Human cytomegalovirus persists in its host and attacks and avoids elimination through the immune system. Crit Rev Immunol **2006**; 26: 231-264
43. **Soderberg-Naucler C**. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? J Intern Med **2006**; 259: 219-246
44. **Sozzani S, Ghezzi S, Iannolo G, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Sica A, Locati M, Mackay C, Wells TN**. Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. J Exp Med **1998**; 187: 439–444.
45. **Spagnoli LG, Bonanno E, Mauriello A, Palmieri G, Partenzi A, Sangiorgi G, Crea F**. Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol **2002**; 40: 1579 –1588
46. **Stagno S**. Cytomegalovirus. In: Remington JS, Klein JO, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Fifth edition. Philadelphia: W.B. Saunders, **2001**: 389-424
47. **Stern JL, Slobedman B**. Human cytomegalovirus latent infection of myeloid cells directs monocyte migration by up-regulating monocyte chemotactic protein-1. J Immunol **2008**; 180: 6577-6585
48. **Streblow DN, Dumortier J, Moses AV, Orloff SL, Nelson JA**. Mechanisms of cytomegalovirus-accelerated vascular disease: induction of paracrine factors that

promote angiogenesis and wound healing. Curr Top Microbiol Immunol **2008**; 325: 397-415

49. **Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA**. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. Curr Opin Immunol **2007**; 19: 577-582
50. **Streblow DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, Smith P, Wakabayashi E, Ruchti F, Mattison K, Altschuler Y, Nelson JA**. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. Cell **1999**; 99: 511-520
51. **Takahashi S.** Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. Biol Pharm Bull **2011**; 34: 1785-1788
52. **Vaida B**. Ein humanes Organkulturmodell zum Studium der HCMV-Infektion. (Humanbiologische Dissertation, Universität Ulm, Abteilung Virologie **2003**)
53. **van de Berg PJ, Heutinck KM, Raabe R, Minnee RC, Young SL, van Donselaar-van der Pant KA, Bemelman FJ, van Lier RA, ten Berge IJ**. Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. J Infect Dis **2010**; 202: 690-699
54. **Varani S, Frascaroli G, Landini MP, Soderberg-Naucler C**. Human cytomegalovirus targets different subsets of antigen-presenting cells with pathological consequences for host immunity: implications for immunosuppression, chronic inflammation and autoimmunity. Rev Med Virol **2009**; 19: 131-145
55. **Varani S, Landini MP**. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. Herpesviridae **2011**; 2:6, 14 pages
56. **Viedt C, Vogel J, Athanasiou T, Shen W, Orth SR, Kubler W, Kreuzer J**. Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-κB and activator protein-1. Arterioscler Thromb Vasc Biol **2002**; 22: 914–920
57. **Zhou YF, Yu ZX, Wanishsawad C, Shou M, Epstein SE**. The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta- receptor. Biochem Biophys Res Commun **1999**; 256: 608-613

7. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Thomas Mertens, danke ich vielmals für die freundliche Überlassung des Themas und den uneingeschränkten Support bei der Durchführung meiner Arbeit.
Frau Dr. Barbara Reinhardt sage ich ganz herzlichen Dank für Ihre intensive Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit sowie die theoretische Unterweisung in die Thematik.
Den Mitarbeitern des Labors von Herrn Professor Dr. Mertens sage ich für die tagtägliche Anleitung bei der Durchführung meiner Experimente meinen aufrichtigen Dank.
Besonders bedanke ich mich bei Anke Lüske für die Einarbeitung in die allgemeine Labortätigkeit und Hilfe. Ebenso danke ich meiner Condoktorandin Sarah Straschewski, und ihrer Betreuerin, Frau Dr. Giada Frascaroli, für praktische Anleitungen.
Frau Ingrid Bennett, rechte Hand des Chefs, sowie dem Computerspezialisten Thomas Schmid danke ich für die Unterstützung bei organisatorischen und EDV-technischen Belangen.
Herrn Professor Dr. Christian Sinzger sage ich herzlichen Dank für die Überlassung seines Virusstammes.
Herrn Professor Dr. mult. Max G. Bachem, Ärztlicher Direktor des hiesigen Instituts für Klinische Chemie, danke ich vielmals für die Durchführung der Multiplex-Suspension-Arrays.
Ebenfalls bedanke ich mich bei der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm für die Bewilligung meines 9-monatigen Promotionsstipendiums „Experimentelle Medizin“, welches mir eine vollzeitige Labortätigkeit ermöglichte.
Und schließlich noch herzlichen Dank an meine Familie und meine Freunde, für all die aufgebrachte Geduld und die Ermunterungen.

8. Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.