

Universität Ulm
Medizinische Klinik und Poliklinik
Abteilung Innere Medizin II
(Kardiologie, Angiologie, Nephrologie und Pneumologie)
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. V. Hombach

**Einflüsse des humanen Zytomegalievirus auf Adhäsion und Chemotaxis
von Monozyten und auf die reaktive Proliferation von humanen glatten
Muskelzellen:
Untersuchungen am koronaren Transfilter Co-Kultur-Modell**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Tanja Elke Göttling
aus Waiblingen

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Rainer Voisard

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Mertens

Tag der Promotion: 19. Januar 2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
2 Material	10
2.1 Zellkultur	10
2.2 Aufarbeitung	13
2.3 Zytologie und Immunzytologie	14
2.4 Pufferlösungen	17
2.5 Mikroskopie und Mikrofotographie	18
2.6 Geräte	18
3 Methoden	20
3.1 Aufbau und Kultivierung des Transfilter Co-Kultursystems	20
3.2 Gewinnung von Monozyten	21
3.3 Versuchsbeschreibung	22
3.4 Aufarbeitung der Transfilter-Co-Kultur	23
3.5 Statistik	26
4 Ergebnisse	27
4.1 HCMV – Infektion	27
4.2 Einfluss einer HCMV-Infektion von Monozyten auf deren Adhäsions- und Migrationsverhalten	31
4.3 Proliferationsstudie	35
5 Diskussion	40
5.1 Die Transfilter-Co-Kultur	40
5.2 Infektion	41
5.3 Adhäsion und Migration	42
5.4 Proliferation	46
5.5 Schlussfolgerung	49

6	Zusammenfassung	51
7	Literaturverzeichnis	53
8	Danksagung.....	59

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-amino-9-ethylcarbacole Substrat
Apo-E	Apolipoprotein-E, Lipoprotein benannt nach der Proteinfraction
BrdU	5-Bromo-2`deoxyuridin, Thymidin-Analogon
CMV	Zytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein, Entzündungsparameter mit multiplen Einflüssen auf das Immunsystem (Komplementsystem, Phagozytose, Thrombozyten-aggregation), synthetisiert in der Leber
DAB	3,3 diaminobenzidin Substrat
EC	Endothelzelle
EGF	epithelialer Wachstumsfaktor
EGM	Wachstumsmedium für Endothelzellen
FGF	Wachstumsfaktor von Fibroblasten
FITC	Flourusceinisothiocyant
HCAEC	humane koronare Endothelzelle
HCMSMC	humane koronare glatte Media-Muskelzelle
HCMV	humanes Zytomegalievirus
HLA	humanes Leukozytenassoziertes Antigen
HMEC	mikrovaskuläre Endothelzellen
HOC	humanes Organkultur-Modell
HUVEC	humane Endothelzellen aus Umbilikalvenen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IE-Antigene	Immediate Early Antigene, die zu Beginn der Infektion exprimierten viralen CMV-Gene
IL	Interleukin
JAM	junctional adhesion molecules
KHK	koronare Herzerkrankung
MACS	magnetisch aktiviertes Zellsortiersystem
MC	Monozyt
MCP-1	Makrophagen-Chemotaktisches-Protein-1

MIEP	major immediate-early promotor gene
MOI 10	multiplicity of infection, Maß für die Menge an Virus: infektiöse Einheiten pro Zelle, hier:10
Mono	Monozyt(en)
NADPH Oxidase	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, Coenzym der Oxidoreduktasen
NFκB	nuklear factor κB, zytoplasmatischer Transskriptionsfaktor
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platlet derived growth factor, Wachstumsfaktor, u.a. aus Thrombozyten
PECAM-1	platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
ROS	reaktive Oxidationsprodukte (z.B. O ₂ ⁻ u.H ₂ O ₂)
SMC	glatte Muskelzelle
SmGM	Wachstumsmedium für glatte Muskelzellen
TCK	Transfilter Co-kultur
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VLA-4	β1-Integrin, Rezeptor auf Endothelzellen, bindet Blutmonozyten
vWF	van Willebrand Faktor

1 Einleitung

Fast die Hälfte (46,8%) aller Todesfälle in Deutschland ließen sich 2002 auf kardiovaskuläre Ursachen zurückführen (47). Zumeist sind atherosklerotische Veränderungen der Gefäße verantwortlich für das Krankheitsgeschehen.

Heute wird die Atherosklerose als entzündliche Erkrankung betrachtet, verursacht auch durch Verletzungen des Gefäßendothels und resultierender Endotheldysfunktion. Aufgrund der Schädigungen kommt es zu vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen für Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten und einer gesteigerten Permeabilität des Endothels. Erste Veränderungen lassen sich als „fatty streaks“ ausmachen, die durch Aufnahme von im Gewebe abgelagerten LDL in Makrophagen, sowie deren Akkumulation und Umwandlung in Schaumzellen, zustande kommen. Durch das inflammatorische Geschehen werden glatte Muskelzellen (SMC) zur Proliferation, Migration und gesteigerten Bildung extrazellulärer Matrix stimuliert. Der chronische Entzündungsprozess führt über ein „remodelling“ der Gefäßarchitektur und damit einer Verdickung der Gefäßwand zu fibrotischen Auflagerungen, die das Gefäßlumen verkleinern. Im Verlauf werden die Ruptur instabiler Plaqueauflagerungen und die Bildung von Thromben durch immunmodulatorische Effekte begünstigt, damit entsteht eine weitere Quelle für ischämische Ereignisse (40).

Hohe Cholesterinspiegel, Tabakkonsum, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Übergewicht, hereditäre Faktoren und Hyperhomozysteinämie gelten, durch ihre endothelschädigende Wirkung, als Hauptriskofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose (28,40). Über den schädigenden Einfluss infektiöser Mikroorganismen, auch des Zytomegalievirus wird weiterhin diskutiert.

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört der Gruppe der Herpesviren an. Die Durchseuchungsrate der Bevölkerung wird mit 50% bis über 90% angegeben. Eine Infektion verläuft beim Immunkompetenten häufig asymptomatisch. Man geht davon aus, dass das Virus latent vor allem in mononukleären Zellen und hämatopoetischen Stammzellen aber auch in Endothelzellen der Gefäßwand bis zu seiner Reaktivierung verbleibt (9, 26,31).

Die HCMV-Infektion wird heute zumindest als ein ursächlicher Faktor in der multifaktoriellen Entwicklung von Atherosklerose, Transplantat-assoziiertes

Atherosklerose des Spenderorgans und Restenose nach Angioplastie angesehen (6). Erste Hinweise zur Beteiligung von Herpesviren ergaben sich 1978 durch Fabricant et al., der Untersuchungen an Hühnern durchführte, die nach Infektion mit dem Marek's disease virus auch unter cholesterinarter Diät atherosklerotische Läsionen entwickelten (14).

Untermauert wird diese Hypothese durch weitere Studien mit unterschiedlichem Ansatz. So konnten in ApoE knockout Mäusen, einem zur Atheroskleroseentwicklung prädisponierten Tiermodell, nach Infektion mit mausspezifischem CMV größere Läsionen gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (22). Epidemiologische Studien zeigen eine Korrelation von hohen Titern an Antikörpern gegen das HCMV und der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung (KHK) bzw. einer höheren Mortalität von Patienten mit bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen (33,44). Dabei konnten für Patienten mit Diabetes mellitus in der ARIC-Studie (44) und für Patienten mit erhöhten CRP-Werten (33) in Verbindung mit einer HCMV Infektion eine zusätzliche Risikoerhöhung ermittelt werden. Manche Autoren vertreten bezüglich der Rolle der Infektion in der Pathogenese die Theorie des „Infectious burden“, danach sind nicht einzelne Erreger Ursache für atherosklerotische Veränderungen oder deren Progression, sondern das Zusammenspiel unterschiedlicher Infektionen. So konnte für Patienten mit positiven Antikörpertitern gegen unterschiedliche Erreger ein, von der Anzahl an Pathogenen abhängiges Maß der Atherosklerose und damit verbundener Mortalitätsrate gefunden werden (13).

Auch wenn diese Beobachtungen eine Verbindung zwischen dem Herpesvirus und Gefäßerkrankungen aufzeigen, sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht aufgeklärt. Bislang konnte nicht sicher gezeigt werden, welchen Einfluss das Virus auf die Proliferation glatter Muskelzellen hat. So verursacht die HCMV Infektion in vitro in humanen Fibroblasten einen Stillstand des Zellzyklus in der späten G1-Phase oder beim Übertritt G2/M (5,11,23,29), und zeigt somit einen antiproliferativen Effekt. Problematisch sind bislang in vitro Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von SMC, da eine replikative Infektion von SMC rasch zum Zelluntergang führt (12). Scharschmidt et al. führen diese zytopathischen Veränderungen auf eine durch CMV veränderte und reduzierte extrazelluläre Matrix zurück. Dies äußert sich in einer verminderten Transskription von Genen, die für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur und interzellulärer Bindungen notwendig sind (41). Wegen der kurzen Lebensdauer von infizierten Zellkulturen haben Reinhardt et al. die Infektion eines humanen

Organkulturmodells (HOC) etabliert, das trotz der produktiven Infektion eine lange andauernde Vitalität der Gefäßzellen aufweist und dadurch längerfristige experimentelle Beobachtungen ermöglicht (39). Versuche an reinen Zellkulturen können wegen der hierbei auftretenden zytopathischen Effekte auch an abortiv¹ infizierten SMC durchgeführt werden, bei denen speziell die Modulation des Zellstoffwechsels durch IE-Antigene beobachtet werden kann. Dabei wird den Antigenen der frühen Replikationsphase (immediate early-Antigen) zugeschrieben, mit der Induktion der S-Phase ein der Zellproliferation förderliches Milieu zu schaffen (8). Kürzlich wurde auch von produktiv infizierten humanen koronaren SMC berichtet, die in vitro nach Infektion (durch ihren Einbau von BrdU) eine Tendenz zur Zellproliferation aufweisen (10).

Die für diese Arbeit verwendeten koronaren Transfilter Co-Kulturen (TCK) imitieren die inneren Schichten der Gefäßwand. Durch einen Polycarbonatfilter getrennt, werden koronare Endothelzellen (HCAEC) und glatte koronare Muskelzellen (HCMSMC) kultiviert. Durch Filterporen ist eine Kommunikation und Migration zwischen beiden Seiten möglich (53). Durch Zugabe von Monozyten (MC) auf die Endothelzellen ist es möglich, die Proliferation der SMC auf der Filterunterseite signifikant zu stimulieren (58). Mit dieser Arbeit sollen die Effekte einer von Monozyten unabhängigen HCMV-Infektion und einer Monozyten-basierten HCMV-Infektion sowohl auf das Proliferationsverhalten der HCMSMC, als auch auf die Adhäsion und Migration der Monozyten herausgearbeitet werden. Hierfür wurde ein Beobachtungszeitraum von zwei Wochen gewählt. Durch die Verwendung der TCK sollen komplexe zelluläre Interaktionen zwischen den HCMSMC und HCAEC mitberücksichtigt werden.

¹ In der Form der abortiven Infektion unterbleibt die Replikation des Virus. Lediglich immediate early (IE-)Antigene der frühen Replikationsphase werden exprimiert. In vitro Modelle dieser Infektionsform können für das CMV durch Infektion mit spezieisfremden Viren (CMV) erzielt werden (12).

2 Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zellen, Virus

- **Humane koronare Endothelzellen (HCAEC):**

Cambrex Bio Science, Verviers Sprl, Belgien; früher Bio Whittaker, Verviers, Belgien.

- **Humane koronare glatte Mediamuskelzellen (HCMSMC):**

Cambrex Bio Science, Verviers Sprl, Belgien

- **Humane Monozyten:**

Isolierung aus Vollblut eines freiwilligen gesunden Spenders der Laborgruppe. Blutentnahme aus der Vena mediana cubiti mittels einer 5ml Monovette mit 0,5 ml Na-Citratlösung.

- **Virus: Humanes Zytomegalievirus (HCMV), Virusstamm TB40E**

Die Infektion der Monozyten und die Bereitstellung des Virus für die zellfreie Infektion erfolgte durch die Abteilung Virologie, Prof. Dr. T. Mertens, Universitätsklinikum Ulm. Der Virusstamm TB40E wurde von PD Dr. Ch. Sinzger, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Kultivierung

2.1.2.1 Kulturmedien und Seren:

- **Smooth Muscle Cell Growth Medium (SmGM):**

- Basismedium SmBM, einem ml sind zugefügt:

- 5 µg Insulin

- 2 ng Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)

- 0,5 ng Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

- 5 % Fötale Kälberserum

- 50 µg Gentamycin

- 50 ng Amphotericin

Basismedium und Zusätze:

Cambrex Bio Science, Verviers Sprl, Belgien.

- **Endothelial Growth Medium (EGM) :**

- Basismedium EBM, einem ml sind zugefügt :

- 12 µl Rinderhirn Extrakt

- 10 ng Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

- 5 % Fötale Kälberserum

- 1 µg Hydrokortison

- 50 µg Gentamycin

- 50 ng Amphothericin

Basismedium und Zusätze:

Cambrex Bio Science, Verviers Sprl, Belgien.

2.1.2.2 Enzymlösungen

- **Trypsin /EDTA**

0,25 mg/ml Trypsin EDTA:

Cambrex Bio Science, Verviers Sprl, Belgien.

2.1.2.3 Adhäsionsfaktoren

- **Kollagen Typ I Gebrauchslösung**

- 1 mg Kollagen Typ I (from rat tail):

Sigma, Taufkirchen

in

- 1 ml 0,1 M Essigsäure:

Merck, Darmstadt

- **Kollagenbeschichtung der Polycarbonatfilter**

- Kollagen Typ I Gebrauchslösung s.o.

- Glutaraldehyd 4%, hergestellt aus Glutaraldehyd 25%:

Merck, Darmstadt

- Ammoniak 25%:

Merck, Darmstadt

2.1.2.4 Kulturgefäße

- **Kulturflaschen zur Massenkultivierung**

75 cm² Zellkulturflasche:

Greiner, Nürtingen

- **Transfilter Co-Kultur-Schale**

- Petrischale: Duran Glas, 80x20 mm:

Merck Eurolab, Darmstadt

- Silikonring: Sylgrad 184 Elastomer Kit :

Sasco, Stuttgart

- Polycarbonat-Rahmen, bestehend aus einem inneren und äußeren Ring:

Makrolan® (Reiff GmbH, Reutlingen), verarbeitet in der Werkstatt der Universität
Ulm, Ø 50 mm

-Silikonschlauch: 0,5 x1,5 mm, Ø 50 mm:

Reichelt-Chemie, Heidelberg

- Polycarbonatfilter: Ø 50 mm, Porengröße 5 mm:

Whatman, Göttingen

2.1.2.5 Bromdesoxy-Uridin-Markierung

Stammlösung:

- 0,62 mg 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) und

-0,53 mg 2'-deoxycytidine HCL:

Serva, Heidelberg

in 1ml Aqua ad injectabilia, steril filtriert.

2.1.3 Leukozyten-Isolierung

2.1.3.1 Magnetisch aktiviertes Zellsortiersystem (MACS)

- **Anreicherung der peripheren mononukleären Blutzellen:**

- Ficoll Separationslösung, Dichte 1,077:

Biochrom, Berlin

- Pre-Separation Filter, Nylon, Porengröße Ø 30 µm:

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

- Puffer: - PBS⁻:

Gibco BRL, Eggenhausen

- MACS- Puffer, bestehend aus:
- 2 mM EDTA (Sigma, Taufkirchen)
- 10 ml humanes Serum (10%): PAA, Cölbe
- 0,5 g Rinder Serum Albumin (0,5%): Sigma, Taufkirchen
- auf 100ml mit PBS⁻ aufgefüllt; steril filtriert.

- **Negativ-Isolierung mit der MidiMACS Trennsäule:**

- MidiMACS magnetic cell separator
- MidiMACS Trennsäule LS+

Beide: Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Puffer für MicroBeads – Markierung: MACS- Puffer

- **Monozyten-Isolierung mit dem Monozyten Isolation Kit:**

- Haptenkonjugierter Anti-CD3, -CD7, -CD19, -CD45RA, -CD56 und -IgE Antikörpercocktail in 0,1% Gelatine, 0,05% Na-Acid
- Anti-Hapten-MikroBeads in 0,1% Gelatine, 0,05% Na-Acid
- FcR Blocking Reagent

Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

2.2 Aufarbeitung

2.2.1 Fixierung

- **Paraformaldehyd, 3,5-3,7%, neutral gepuffert:**

Otto Fischar KG, Saarbrücken

- **Methanol:**

Merck, Darmstadt

2.2.2 Einbettung

- **Araldit (Epoxidharz)**

Gebrauchslösung aus:

- 113 g Araldit C 212
- 111g Härter HY 964
- 5g Beschleuniger DY 964

alle: Serva, Heidelberg

- **Einbettung in Araldit**

- Glutaraldehyd

- Ethanol abs.

- 1,2 Propylenoxid:

alle: Merck, Darmstadt

- Araldit-Gebrauchslösung

2.2.3 Schneiden

Mikrotom: Leica ULTRACUT

Glasmesserbrecher

beide: Leica Microsystems, Wetzlar

Objektträger: Poly-L-Lysin :

Langenbrink, Emmendingen

2.2.4 Herauslösen von Araldit

- Methanol

- 1,2 Propylenoxyd

- Kaliumhydroxydplättchen

alle: Merck, Darmstadt

2.3 Zytologie und Immunzytologie

2.3.1 Farbstoffe und Färbelösungen

- **Toluidinblau Stammlösung:**

- 1g Toluidinblau:

Fluka Chemie AG, Buchs, CH

- 1g Natriumtetraborat:

Merck, Darmstadt

Gebrauchslösung: 1:1 Mischung der Stammlösung mit H₂O

- **Mayers-Hämalaun:**

Chroma-Gesellschaft Köngen

- **4',6-Diamino-2-phenylindole x 2 HCL (DAPI):**

Serva, Heidelberg

- DAPI-Stammlösung: 5µg DAPI/ml PBS+

- Gebrauchslösung: 400µl Stammlösung in 19,6 ml Methanol

2.3.2 Reagenzien für die Immunfluoreszenzzytologie

2.3.2.1 Erstantikörper

- **Anti-BrdU**

Monoklonaler Mausantikörper gegen das Thymidinanalogon BrdU,

1:100 verdünnt mit Tween 80, 0,5%:

Dakopatts GmbH, Hamburg

- **Anti-von-Willebrand-Faktor**

Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes endotheliales vWF-Protein,

1:50 verdünnt mit PBS⁻:

Dakopatts GmbH, Hamburg

- **Anti-CD 68**

Monoklonaler Mausantikörper gegen monozytäres CD68-Antigen

1:100 verdünnt mit PBS⁻:

Dakopatts GmbH, Hamburg

- **Anti-Cytomegalovirus**

Monoklonaler Mausantikörper gegen das „delayed early DNA-binding protein p52“,

1:50 verdünnt mit PBS⁻:

Dakopatts GmbH, Hamburg

2.3.2.2 Zweitantikörper

- **Pferd-Anti-Maus-biotinyliert**

Antikörper gegen Maus IgG (hier gegen Anti-BrdU), 1:100 verdünnt mit PBS⁻:

Vector Laboratories, Alexis Deutschland, Grünberg

- **Ziege-Anti-Kaninchen-biotinyliert**

Antikörper gegen Kaninchen IgG (hier gegen Anti-vWF), 1:100 verdünnt mit PBS⁻:

Vector Laboratories, Alexis Deutschland, Grünberg

- **Ziege-Anti-Maus-Tetramethylrhodaminisocyanat**

Antikörper gegen Maus IgG (hier gegen Anti CD 68), 1:30 verdünnt mit PBS⁻:

Dianova Immunotech, Hamburg

- **Ziege-Anti-Maus-Alexa-Fluor 488**

Alexa-Fluor 488 markierter Antikörper gegen Maus IgG (hier gegen Anti-CMV), 1:500 verdünnt mit PBS⁻:

MoBiTel, Göttingen

2.3.3 Reagenzien für die Immunzytochemie

- **AB-Reagenz: Avidin-Biotin-Peroxidase:**

Vector Laboratories, Alexis Deutschland, Grünberg

- **AEC Substrat Kit für Peroxidase, (3-amino-9-ethylcarbacole)**

- **DAB Substrat Kit für Peroxidase, (3,3-diaminobenzidine):**

Beide: Vector Laboratories, Alexis Deutschland, Grünberg

- **Wasserstoffperoxid, in Methanol,**

5 ml H₂O₂ 30% in 200ml Methanol und

- **Wasserstoffperoxid, 3%, in PBS⁻ :**

20 ml H₂O₂ 30% in 200ml PBS :

- H₂O₂ 30%:

Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

- **1N Salzsäure:**

Merck, Darmstadt

2.3.4 Normalseren

- **Ziegen-Normalserum**

1:10 verdünnt mit PBS⁻:

Dianova Immunotech, Hamburg

- **Pferde-Normalserum**

1:10 verdünnt mit PBS⁻:

Dianova Immunotech, Hamburg

2.3.5 Einschlußmedien

- **Mowiol, Einschlußmedium für Immunfluoreszenz**

Gebrauchslösung:

- Mowiol 4-88:

Calbiochem, La Jolla, USA

- Glycerin für Fluoreszenzmikroskopie:

Merck, Darmstadt

- Tris-Puffer

- **Entellan®, Einschlußmedium für Toluidinblau gefärbte Präparate**

- **Kaiser`s Glyceringelatine, Einschlußmedium für Färbungen mit alkohollöslichen Farbstoffen:**

beide: Merck, Darmstadt

2.4 Pufferlösungen

- **Phosphate buffered saline without Calcium and Magnesium, pH 7,4, PBS⁻ :**

- 8,0 g NaCl: C. Roth GmbH + Co., Karlsruhe

- 0,2 g KCl: Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

- 0,2 g KH₂PO₄: Merck, Darmstadt

- 1,45g Na₂HPO₄ x 2 H₂O: Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

gelöst in 1000 ml Aqua bidest, Einstellung pH 7,4,

bzw. als Gebrauchslösung:

Gibco BRL, Eggenhausen

- **Phosphate buffered saline with Calcium and Magnesium, pH 7,4, PBS⁺:**

Gibco BRL, Eggenhausen

- **Natriumacetatpuffer, pH 5,2**

- 210 ml 0,1 N Essigsäure: Merck, Darmstadt

- 700 ml 0,1M Natriumacetat: Riedel de Haën, Seelze

- **Tween 80, 0,5% in PBS⁻**

- 5 ml Tween 80 : Serva, Heidelberg

in 955 ml PBS⁻

- **Tris-Puffer, pH 8,5**

- 2,24 g Tris : Amershen Pharmacia Biotech AB, Upsala, Schweden

in 100ml Aqua dest.

2.5 Mikroskopie und Mikrofotographie

2.5.1 Mikroskopie

- **Nikon Optiphot-Mikroskop**

mit den Hellfeldobjektiven CF Planapochromat 4/0,20; 10/0,40; 40/1,0 oil; 60/1,4 oil und 100/1,35 oil.

Zusätzlich Auflichtfluoreszenzeinrichtung mit folgenden Filterkombinationen:

- Grünanregung: Erregungsfilter: EX 546/10, Dichroicspiegel DM 580, Sperrfilter: BA 580
 - Blauanregung: Erregungsfilter: EX 470-490, Dichroicspiegel DM 510, Sperrfilter: BA 520
- Nikon, Düsseldorf

2.5.2 Mikrophotographie

- **Spiegelreflexkamera: Nikon F 601**

Nikon, Düsseldorf

- **Filme:**

- Fujichrome professional 64 ASA
- Fujichrome provia 400 ASA

- **Digitalkamera:**

Coolpix, Nikon, Düsseldorf

2.6 Geräte

- **Autoklav:**

Integra Biosciences, Fernwald

- **Laminarflow-Sterilarbeitsbank:**

BDK, Luft-und Reinraumtechnik, Sonnenbühl

- **Lamin Air HB 2472 Sterilarbeitsbank:**

Heraeus, Fellbach

- **Zentrifugen:**

- Varifuge 3.0R: Heraeus, Fellbach

- **Zellcounter: Casy TTC:**

Schärfe, Reutlingen

- **Inkubator für Zell- und Gewebeskultur B5061 5% CO₂ und**
 - **Inkubator für Zell-und Gewebekultur Hera cell, beide:**
- Heraeus, Fellbach

3 Methoden

3.1 Aufbau und Kultivierung des Transfilter Co-Kultursystems

3.1.1 Kollagenbeschichtung der Polycarbonatfilter

Die Filter werden bei 4°C mit lathyritisches Kollagen beidseits beschichtet. Zur Quervernetzung des Kollagens werden die Filter 3 Minuten über Ammoniakdampf gehalten und anschließend 3 Stunden in 4% Glutaraldehyd fixiert. Nach mehrmaligem Spülen in physiologischer Kochsalzlösung erfolgt die Sterilisation der Filter mittels UV-Licht für 15 Minuten pro Seite (2.1.2.3).

3.1.2 Einspannen der Filter

Die beschichteten Polycarbonatfilter werden zwischen innerem und äußerem Ring des autoklavierten Filterrahmens eingespannt. Nach Befüllen der Kulturschale mit 5 ml SMC-Medium wird der Ring eingelegt, dabei zeigt der innere Ring nach unten. Anschließend Befüllen des oberen Kompartiments mit 3ml Medium. Eine Schraube in den Entlüftungskanälen verhindert den Abfluss des Kulturmediums (2.1.2.4).

3.1.3 Zellaussaat

In einem ersten Schritt werden auf die spätere Filterunterseite in SmGM suspendierte HCMSMC in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät. Nach 20 h Inkubationszeit werden die Filterrahmen gewendet, die Schrauben aus dem Lüftungskanal entfernt und das Medium erneuert. Im Anschluss werden auf der Filteroberseite in EGM suspendierte HCAEC in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgebracht (2.1.1; 2.1.2).

3.1.4 Kultivierung

Inkubation der Zellkulturen bei 37 °C und einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ im Brutschrank (2.6). Über den CO₂ Partialdruck wird das CO₂/HCO₃⁻ - Puffersystem des Mediums in einem pH-Bereich von 7,2 -7,4 konstant gehalten. Ein Mediumwechsel erfolgt dreimal wöchentlich. Zunächst werden alle Kulturen über 14 Tage kultiviert.

3.2 Gewinnung von Monozyten

3.2.1 Magnetisch aktiviertes Zellsortiersystem

3.2.1.1 Anreicherung der mononukleären Zellfraktion

Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation werden periphere mononukleäre Blutzellen in folgenden Schritten gewonnen (2.1.3.1):

- Verdünnung des Citratblutes mit der dreifachen Menge an PBS⁻.
- Überschichten von 15 ml Ficoll mit 35 ml Citratblut – PBS⁻-Gemisch. 20 min Zentrifugation bei 800 g, bei 20°C, ohne Bremse.
- Gewinnung der Interphase und Auffüllen auf 50ml mit PBS⁻. 10 min Zentrifugation bei 300 g, bei 20°C mit Bremse.
- Zweimaliges Spülen des Pellet unter Suspension in 50 ml PBS⁻+ 2mM EDTA und 10 min Zentrifugation bei 200 g, bei 20°C.
- Aufnahme des Pellet in 10 ml PBS⁻+ 2mM EDTA und Filtration mit Pre-Separation-Filter.
- Ermittlung der Zellzahl.
- 10 min Zentrifugation bei 200 g bei 20°C.

3.2.1.2 Isolierung der Monozyten

Die Monozyten-Isolierung aus der angereicherten mononukleären Zellfraktion erfolgt mit Hilfe des MidiMACS-Systems. Sämtliche Schritte werden bei einer Temperatur von 6° - 12°C durchgeführt (2.1.3.1):

- Aufnahme des Pellet in 60 µl MACS-Puffer/ 10⁷ Zellen.
- Zugabe von 20 µl FcR / 10⁷ Zellen und 20 µl Hapten – Antibody cocktail/ 10⁷ Zellen.
- Inkubation des Gemisches für 5 min.
- Zweimaliges Spülen durch Verdünnung mit der zehnfachen Menge an MACS-Puffer und 10 min Zentrifugation bei 200 g, bei 6°C.
- Aufnahme des Pellet in 60µl/10⁷ Zellen MACS-Puffer.
- Zugabe von 20µl/10⁷ Zellen FCR Blocking Reagent und 20 µl/10⁷ Zellen MACS anti Hapten Micro Beads
- Inkubation des Gemisches für 15 min.
- Zweimaliges Spülen durch Verdünnung mit der zehnfachen Menge an MACS-Puffer und

- 10 min Zentrifugation bei 200 g, bei 6°C.
- Pellet in 500µl/max.10⁸ Zellen aufnehmen.
- Einsetzen der MidiMACS-Trennsäule ohne Stempel in eine permanentmagnetische Halterung, welche in den Metallfasern der Säule ein magnetisches Feld induziert.
- Befüllen der mit 3 ml Puffer gefüllten Säule mit Zellsuspension und Nachspülen mit 9 ml Puffer.
- Auffangen der Zellfraktion isolierter Monozyten und Zellzählung
- 10 min Zentrifugation bei 200 g, bei 6°C.
- 1,2 x 10⁶ Zellen werden abgetrennt und in 1 ml Medium (EGM) aufgenommen. Diese Zellen werden an die Abteilung Virologie zur CMV-Infektion weitergegeben.

3.3 Versuchsbeschreibung

3.3.1 Vorkultivierung

Für sämtliche Versuche werden die TCK 14 Tage, gezählt ab dem Tag der Aussaat der zweiten Zellart vorkultiviert, um eine konfluente HCAEC-Schicht und eine mehrlagige HCMSMC-Schicht als Grundlage für die Versuche zu erhalten.

Die Schalen können nun entsprechend dem Versuchsprotokoll weiterverwendet werden.

3.3.2 Versuchsprotokoll

Nach oben beschriebener Vorkultivierung erfolgt die randomisierte Zuteilung der einzelnen Co-Kulturschalen zu den einzelnen Versuchsgruppen:

Jeweils vier Schalen zur Aussaat nicht infizierter und infizierter Monozyten, weitere vier zur Zugabe von TB40E-Virus, eine letzte Gruppe dient als Kontrollgruppe.

Entsprechend der Versuchsgruppe Aussaat der Monozyten und infizierten Monozyten, die am Vortag isoliert und teilweise in der Abteilung Virologie mit Virus infiziert wurden und Ausbringen der Virussuspension.

Weitere Kultivierung der Co-Kulturschalen. Die Fixierung erfolgt in jeder Versuchsgruppe nach 24h, nach 4, nach 7 und nach 14 Tagen. Jeweils 18 Stunden vor Fixierung Zusatz von BrdU (10µl Stammlösung/ 1ml Medium) als Marker für die Proliferationsrate zum Medium.

Nach diesem Protokoll werden insgesamt drei Versuchsreihen durchgeführt.

3.3.3 Zugabe von Monozyten und Virus

Auf je vier Schalen werden 3×10^5 Monozyten pro Schale ausgebracht. Weitere vier TCK werden mit der gleichen Anzahl infizierter Monozyten versetzt, auf vier Schalen wird eine Virussuspension in einer Konzentration von 10 infektiösen Einheiten pro Zelle (MOI 10) gegeben. Vier TCK dienen als Kontrollgruppe.

3.4 Aufarbeitung der Transfilter-Co-Kultur

3.4.1 Herstellung und Aufbereitung von Aralditschnitten

- **Fixierung in Paraformaldehyd**

Nach zweimaligem Spülen der Kulturen mit PBS⁺ wird die Schale mit Paraformaldehyd befüllt (2.2.1) und mindestens 3 Stunden belassen. Danach erfolgt ein Austausch mit PBS⁺ und Lagerung bei 4°C.

- **Einbettung in Araldit**

- Zweimaliges Spülen der TCK-Filter in PBS⁻.

- Entwässerung der Zellen durch aufsteigende Alkoholreihe:

 - Verweildauer jeweils 20 min in Ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 96% und 3x100%

- Austausch des Alkohols durch Propylenoxid mittels einer Propylenoxid/Ethanol-Lösung in aufsteigender Propylenoxid-Konzentration:

 - Verweildauer jeweils 10 Minuten in Propylenoxid/Ethanol-Gemischen: 2:4, 1:1, 4:2 und 2x in unverdünntem Propylenoxid.

- Austausch von Propylenoxid gegen Araldit:

 - Verweildauer der Filter für jeweils 1 Stunde in einem Propylenoxid/Araldit-Gemisch von 1:1 und 3:1, für weitere 2-5 Stunden in reinem Araldit.

- Einbettung der Filter in reinem Araldit in Kautschukformen und Polymerisation des Kunstharzes bei 60°C über 72 Stunden (2.2.2).

- **Schneiden der Aralditblöcke**

Aus den Aralditblöcken werden am Rotationsmikrotom mit einem Glasmesser Semidünnschnitte von 4µm Dicke angefertigt. Die Schnitte werden auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen und bei 60°C getrocknet (2.2.3).

- **Herauslösen von Araldit**

Zur Freilegung der antigenen Strukturen für immunhistologische Färbungen wird das Araldit wie folgt ausgelöst (2.2.4):

- Herstellen einer Lösung von 40g KOH-Plätzchen in 200ml Methanol und 100 ml Propylenoxid unter 25 min Rühren.
- Inkubation der Schnitte in der KOH/Methanol/Propylenoxidlösung für 8 min.
- Inkubation der Schnitte für 5 min in Methanol/Aqua 1:1.
- Zweimaliges Waschen in PBS⁻.

3.4.2 Morphologie und Zytologie

- **Toluidinblaufärbung**

Die auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgezugene TCK-Filterschnitte werden bei 80°C mit Toluidinblaulösung gefärbt. Sobald sich ein „Goldrand“ ausbildet, wird der Farbstoff abgekippt und der Objektträger mit Aqua dest. gespült. Nach erneutem Trocknen werden die Filter in Entellan eingeschlossen (2.3.1; 2.3.5).

3.4.3 Adhäsions- und Migrationsstudien; CMV-Infektion

3.4.3.1 CD68/CMV – Immunfluoreszenz-Doppelfärbung an Zellen auf Filtern

Sowohl Adhäsion und Migration, als auch die Infektion wird auf 1,5-2 cm² großen Ausschnitten des TCK-Filters untersucht. Der Zellenachweis erfolgt mittels indirekter Immunfluoreszenzzytochemie nach folgendem Protokoll (2.3; 2.4):

- mehrmaliges Spülen der Filter mit PBS⁻.
- Inkubation des 1. Antikörpers Anti-CD68, 1:100, 40 min, anschließend Spülen der Filter mit PBS⁻.
- Inkubation des 2. Antikörpers Ziege-Anti-Maus-TRITC 1:30, 40 min, anschließend Spülen der Filter mit PBS⁻.
- Inkubation des 1. Antikörpers Anti-CMV, 1:50, 40 min, anschließend Spülen der Filter mit PBS⁻.

- Inkubation des 2. Antikörpers Ziege-Anti-Maus-Alexa 1:500, 40 min, anschließend Spülen der Filter mit PBS⁻.
 - Inkubation der DAPI-Gebrauchslösung zur Kernfärbung, 5 min, anschließend Spülen der Filter mit PBS⁻.
 - Einbetten in Mowiol, die HCAEC-Seite kommt nach oben zu liegen.
- Inkubationsschritte werden bei 37°C im Brutschrank durchgeführt, Spülschritte bei Raumtemperatur.

3.4.3.2 Auswertung der Filter

Adhäsion, Migration und Infektion werden an der Filteraufsicht ausgewertet. Die Anzahl positiv gefärbter Zellen pro Sichtfeld wird am Mikroskop mit dem x40 Objektiv ausgezählt. Die positiven Zellen in den Kompartimenten Filterober- und Filterunterseite werden getrennt erfasst. Pro Filter werden jeweils zehn Sichtfelder beider Seiten ausgewertet (2.5).

3.4.4 Proliferationsstudien

Als Marker der Zellproliferation dient das 18 Stunden vor Fixation zugegebene Thymidinanalogon BrdU. Dieses wird in der S-Phase des Zellteilungszyklus aktiv in die DNA eingebaut (2.3;2.4).

3.4.4.1 BrdU und von Willebrand-Faktor Peroxidase-Doppelfärbung

- Auslösen des Araldit, siehe oben.
- Spülen in PBS⁻.
- Vorbehandlung mit H₂O₂ in Methanol für 10 min, hierdurch wird die endogene Peroxidase inaktiviert; anschließend spülen in PBS⁻.
- Denaturierung der DNA in 1N HCl für 20 min, um antigene Strukturen des eingebauten BrdU frei zu setzen; anschließend spülen in PBS⁻.
- Inkubation von Pferde-Serum 1:10 in PBS, 20 min.
- Inkubation des 1. Antikörper: Anti-BrdU 1:100 in 0,5% Tween 80 in PBS⁻, 40 min, anschließend spülen in PBS⁻.
- Inkubation des 2. Antikörper: Pferd-Anti-Maus-biotinyliert 1:100 in PBS⁻, 10 min, anschließend spülen in PBS⁻.
- Inkubation des AB-Komplexes 1:100 in PBS⁻, 10 min, anschließend spülen in PBS⁻.
- Zugabe des DAB-Substrates, 5 min, anschließend spülen in PBS⁻.

- H₂O₂ 3% in PBS⁻, 10 min, anschließend spülen in PBS⁻.
 - Inkubation von Ziegen-Serum 1:10 in PBS⁻, 20 min .
 - Inkubation von 1. Antikörper: Anti-von Willebrand 1:100 in PBS⁻, 40 min, anschließend spülen in PBS⁻.
 - Inkubation von 2. Antikörper: Ziege-Anti-Kaninchen-biotinyliert 1:100 in PBS⁻, 10 min, anschließend spülen in PBS⁻.
 - Inkubation des AB-Komplexes 1:100 in PBS⁻, 10 min, anschließend spülen in PBS⁻.
 - Zugabe des AEC-Substrates, 9 min, anschließend spülen in Aqua dest..
 - H₂O₂ 3% in PBS⁻, 10 min, anschließend spülen in Aqua dest..
 - Kernfärbung in Hämalaun, 2 min mit anschließendem Wässern in Leitungswasser.
 - Einbetten in Kaisers Glyceringelatine,
- Inkubationsschritte werden bei 37°C im Brutschrank durchgeführt, Spülschritte bei Raumtemperatur.

3.4.4.2 Auswertung der Proliferationsrate

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von HCAEC oder HCMSMC wird der Quotient aus BrdU-positiven Zellen zur Gesamtzahl der Kerne bestimmt. Pro Teilversuch werden jeweils zehn Schnitte ausgewertet. Die Identifikation der HCAEC erfolgt über die positive Färbung des von Willebrandt Faktors, wohingegen die HCMSMC keine Anfärbung aufweisen.

3.5 Statistik

Die Daten werden mit dem Programm Statistica (Version 5.1; StatSoft, Inc. Tulsa, USA) entsprechend der Vorgaben der Abteilung Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm ausgewertet. Statistisch signifikante Unterschiede der Zelladhäsion und Migration, sowie der Zellproliferation werden mit dem Mann-Whitney Rangsum Test festgestellt. Unterschiede zwischen den Gruppen werden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung tabellarisch und graphisch dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 HCMV – Infektion

Untersucht werden die zellassozierte und die zellfreie Infektion von HCAEC und HCMSMC 1, 4, 7 und 14 Tagen nach Aussaat von HCMV-infizierten (TB40E) Monozyten und Infektion mit zellfreien Viren.

Der Nachweis infizierter Zellen erfolgt in der Filteraufsicht mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das virale delayed-early-Antigen in der positiven indirekten Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 1).

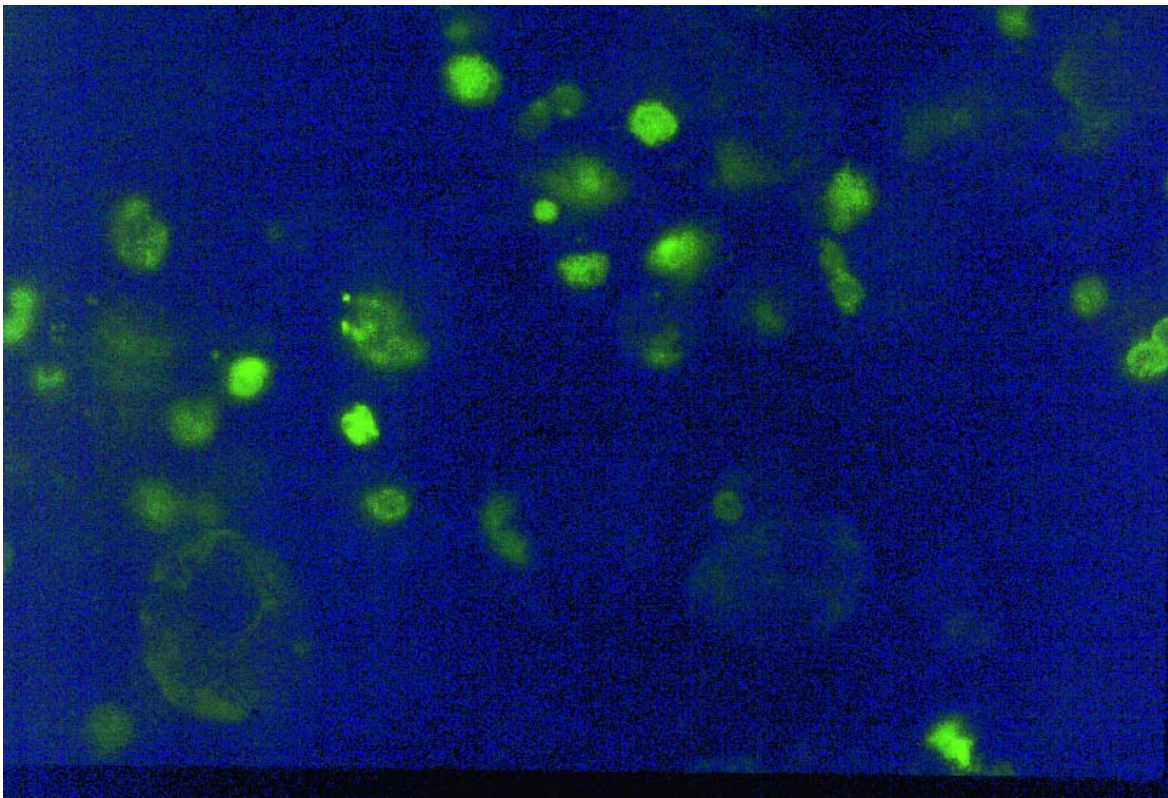


Abb. 1: HCMV(TB40E) infizierte Zellen in der Filteraufsicht (14 Tage nach Infektion)

Die Ergebnisse zur zellfreien Infektion und der Monozyten-basierten Infektion sind in den Tabellen 1 und 2 und den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

Eine Infektion kann sowohl bei den HCAEC, als auch den HCMSMC beobachtet werden. Nach der MC-assoziiierter Infektion ist die Infektion bei beiden Zellarten weniger stark ausgeprägt und erfolgt verspätet.

So zeigt sich bei den HCAEC bereits 4 Tage nach zellfreier Infektion eine, gegenüber der MC-assoziierten Infektion signifikant erhöhte Infektionsrate ($0,73 \pm 1,18$; $p=0,001$). Diese Beobachtung setzt sich für die Tage 7 ($6,3 \pm 6,26$) und 14 ($12,1 \pm 16,91$, n.s.) fort. Die Infektionsrate durch zellfreie Infektion ist am Tag 7 verglichen mit der MC-basierten Infektion ($0,10 \pm 0,31$) signifikant um den Faktor 63 ($p < 0,001$) gesteigert. Mit dem starken Anstieg der Zahl infizierter Endothelzellen nach der Monozyten-assoziiierter Infektion auf $6,75 \pm 10,07$ ab Tag 14 nähern sich die Infektionsraten beider Infektionsmodi an, es bleibt lediglich eine nicht signifikante 1,8-fach stärkere Infektion der zellfreien Infektion erhalten.

Tab. 1: HCMV-Infektion (TB40E) der HCAEC.

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der HCMV-positiven Zellen/Gesichtsfeld mit den jeweiligen Standardabweichungen

	1d	4 d	7d	14d
CMV	0,3	0,73	6,3	12,10
sd	0,7	1,18	6,26	16,91
Mono/CMV	0,03	0	0,10	6,75
sd	0,16	0	0,31	10,07

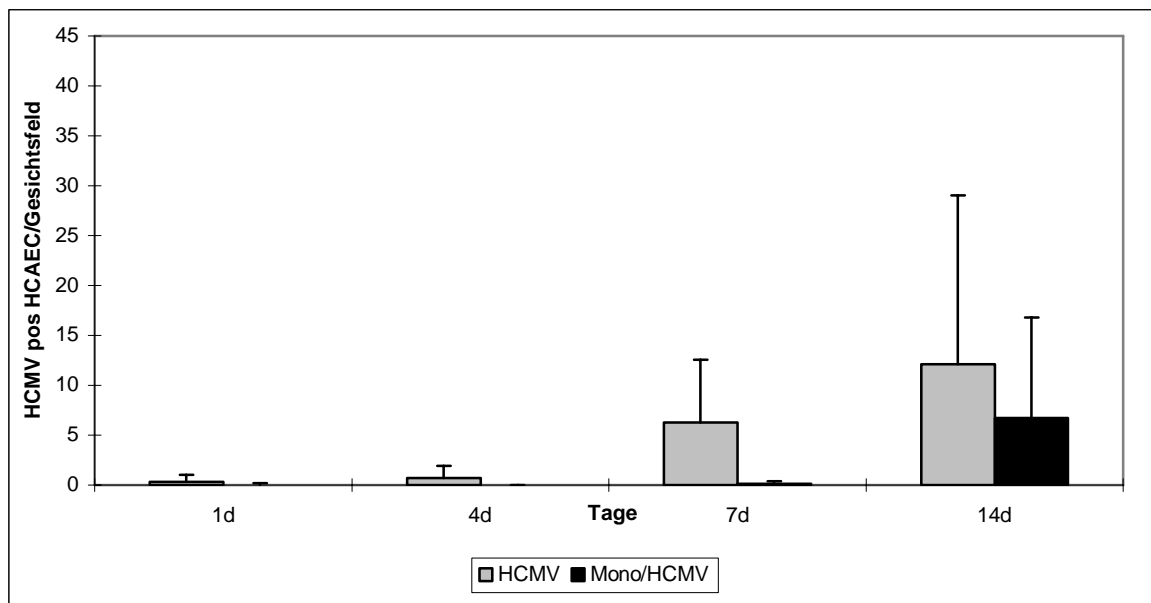


Abb. 2: Darstellung der Infektionsrate der HCAEC nach Infektion durch zellfreies HCMV(TB40E) oder mittels zellassoziertem HCMV(TB40E) .

Für die HCMSMC zeigt sich am Tag 7 nach zellfreier Infektion eine signifikante Zunahme der Zahl infizierter SMC auf $2,45 \pm 3,94$ infizierte Zellen/Gesichtsfeld, gegenüber 0 infizierten Zellen nach MC-assoziiierter Infektion ($p=0,001$). Bei den Untersuchungen am Tag 14 zeigt sich eine weitere Steigerung auf $23,9 \pm 15,24$ Zellen. Zu diesem Zeitpunkt setzt nun auch die Infektion der mit zellassoziert infizierten Kulturen ein. Die Infektionsrate erreicht am Tag 14 mit $3,33 \pm 5,46$ infizierten Zellen 13,9% der Infektionsrate der zellfreien Infektion und ist damit noch signifikant geringer ausgeprägt ($p < 0,001$).

Tab. 2: HCMV(TB40E)-Infektion der HCMSMC.

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der HCMV-positiven Zellen/Gesichtsfeld mit den jeweiligen Standardabweichungen

	1d	4 d	7d	14d
CMV	0,23	0,13	2,45	23,90
sd	0,57	0,33	3,94	15,24
Mono/CMV	0	0	0	3,33
sd	0	0	0	5,46

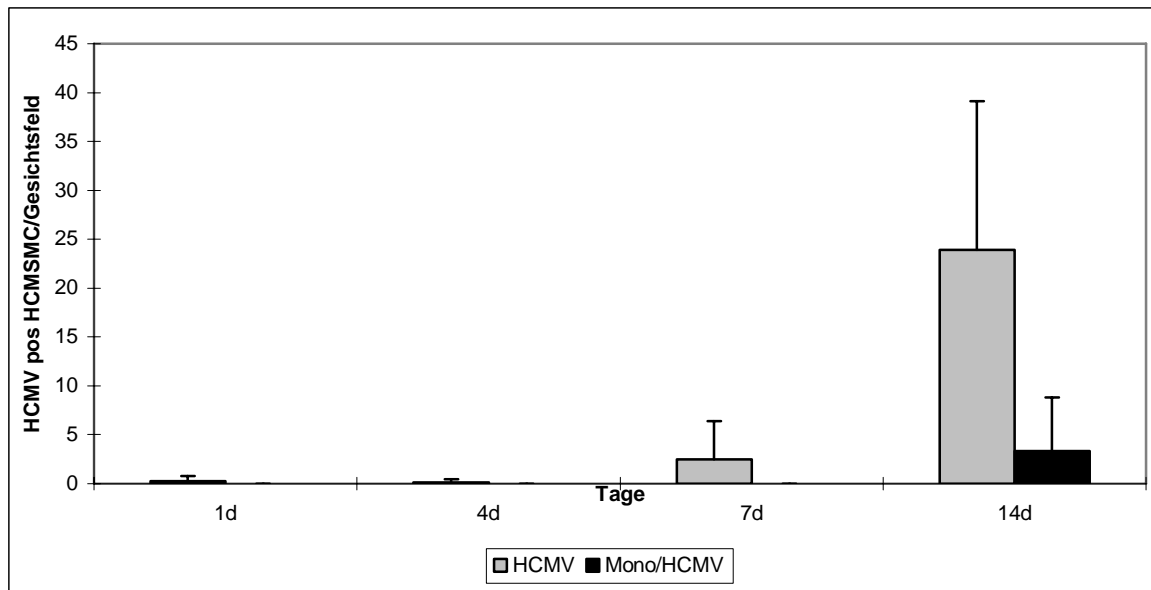


Abb. 3: Darstellung der Infektionsrate der HCMSMC nach Infektion durch zellfreies HCMV(TB40E) oder mittels zellassoziertem HCMV(TB40E) .

4.2 Einfluss einer HCMV-Infektion von Monozyten auf deren Adhäsions- und Migrationsverhalten

4.2.1 Adhäsionsstudie

Untersucht wird das Adhäsionsverhalten infizierter und nicht-infizierter Monozyten in einer Transfilter-Co-Kultur 1, 4, 7 und 14 Tage nach Aussaat der Monozyten.

Die Identifizierung der MC auf der HCAEC-Seite erfolgt mittels eines Anti-CD-68-Antikörpers in der positiven indirekten Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 3;4).

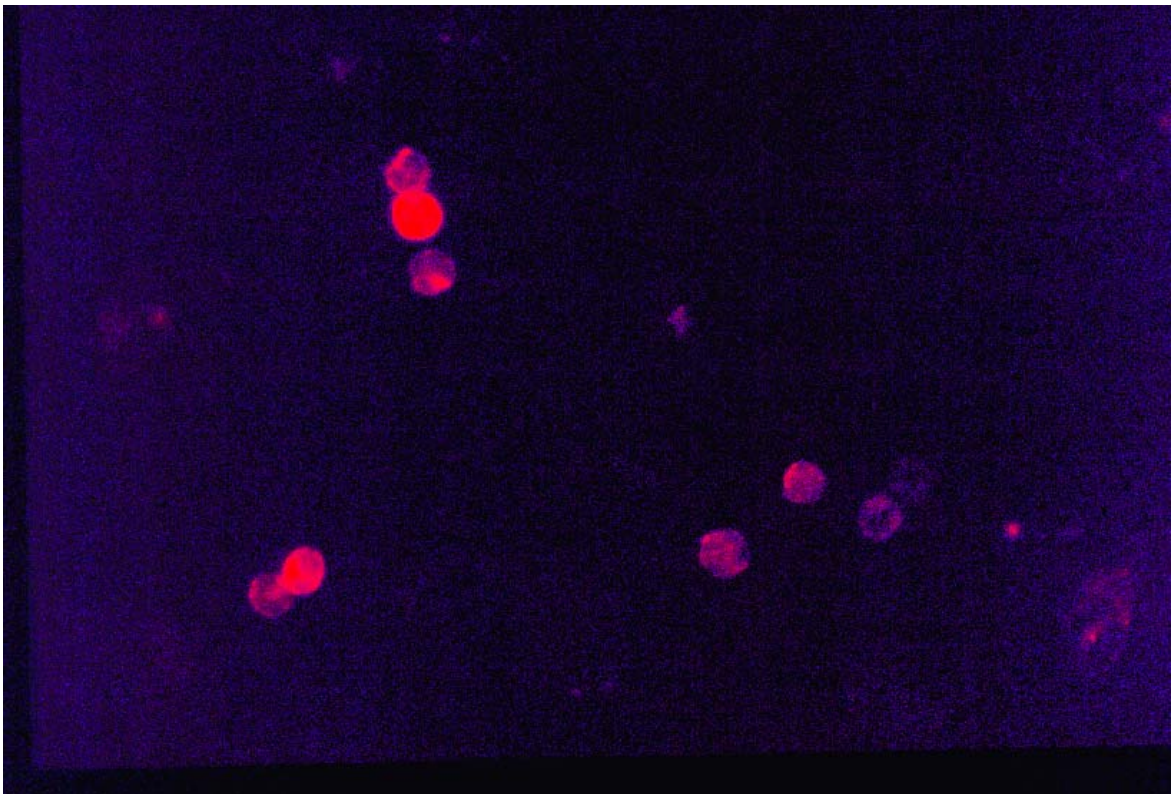


Abb. 3: Adhärenz Monozyten auf der Transfilter-Co-Kultur

Darstellung der Ergebnisse in den Untersuchungen zur Adhäsion in Tab.3 und Abb.4

HCMV-infizierte Monozyten adhären zu allen Untersuchungszeitpunkten im geringeren Maß als Nicht-Infizierte. Eine signifikante Minderung der Adhäsionsrate infizierter MC ($1,53 \pm 1,99$) auf 37% gegenüber der von Nicht-Infizierten ($4,13 \pm 3,55$) ergibt sich bei der Untersuchung nach 24 Stunden ($p < 0,001$). Ebenso zeigt sich die Adhäsion nach 14 Tagen

bei den infizierten MC mit $1,5 \pm 1,97$ im Vergleich zu den nicht infizierten MC ($5,33 \pm 4,23$) signifikant auf 28% vermindert ($p < 0,001$).

Verminderte Adhäsionsraten ergeben sich für die infizierten Monozyten auch zu den Zeitpunkten 4 Tage ($1,88 \pm 2,14$) und 7 Tage ($2,17 \pm 2,31$) mit einer Reduktion der Adhäsion auf jeweils 43% verglichen mit der bei nicht-infizierten MC, dabei wird jedoch eine statistische Signifikanz nicht erreicht.

Tab. 3: Monozytenadhäsion HCMV(TB40E)-infizierter und nicht-infizierter MC.

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der CD68-positiven Monozyten/Gesichtsfeld mit den jeweiligen Standardabweichungen

	1d	4 d	7d	14d
Mono	4,13	4,35	5,08	5,33
sd	3,55	4,87	7,25	4,28
Mono/CMV	1,53	1,88	2,17	1,50
sd	1,99	2,14	2,31	1,97

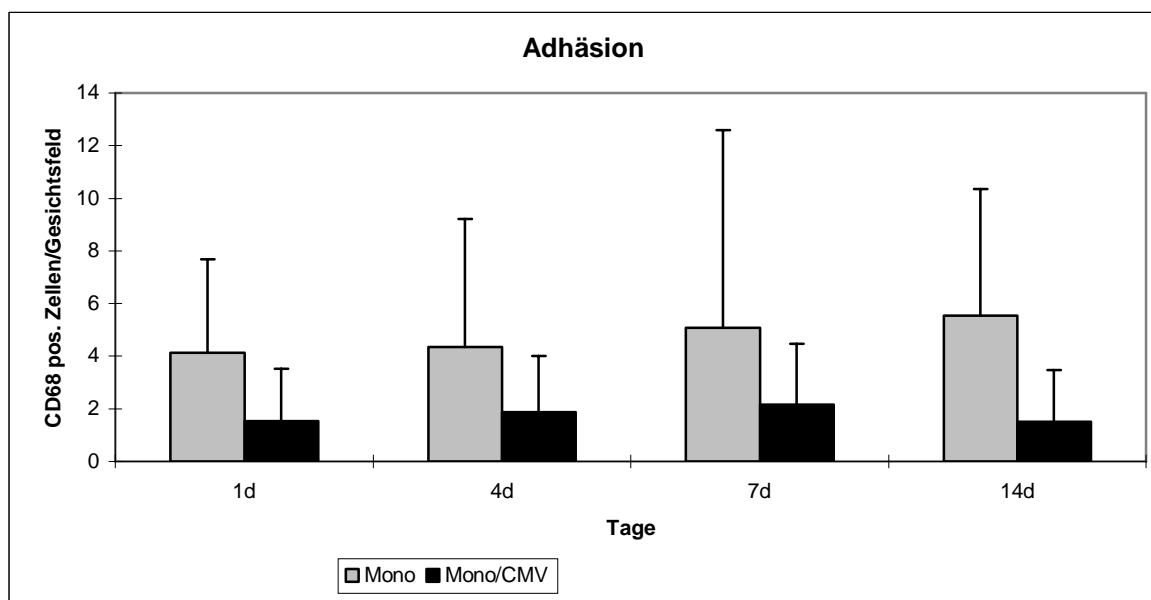


Abb. 4: Darstellung der Adhäsion infizierter und nicht-infizierter Monozyten: Verringerung der Adhäsionsrate von MC bei HCMV(TB40E)-Infektion.

4.2.2 Migrationsstudie

Beobachtet wird die chemotaktische Bewegung infizierter und nicht-infizierter Monozyten durch die Filterporen zu den Untersuchungszeitpunkten 1, 4, 7 und 14 Tage nach Aussaat der Monozyten.

Die Identifizierung der MC auf der HCMSMC-Seite erfolgt mittels eines Anti-CD-68-Antikörpers in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung.

Darstellung der Ergebnisse in den Untersuchungen zur Migration in Tab.4 und Abb.5

Nach 24 Stunden ist für die nicht-infizierten MC keine Migrationsbewegung erkennbar. Demgegenüber zeigen die infizierten MC in dieser frühen Versuchsphase ein signifikant erhöhtes Migrationsverhalten ($2,48 \pm 3,8$; $p < 0.001$), welches zu den späteren Untersuchungszeitpunkten nicht mehr erkennbar ist. Zu den Beobachtungszeitpunkten 4, 7 und 14 Tage sind sowohl für infizierte, als auch für nicht-infizierte Monozyten nur noch eine geringe Passagen der Filterporen nachweisbar, im Vergleich beider Monozyten-Gruppen lässt sich nunmehr kein signifikanter Unterschied der Migration erkennen.

Tab. 4: Migration HCMV(TB40E)-infizierter und nicht-infizierter MC.

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der CD68-positiven Monozyten/Gesichtsfeld mit den jeweiligen Standardabweichungen

	1d	4 d	7d	14d
Mono	0	0,73	0,35	0,50
sd	0	1,43	0,70	1,09
Mono/CMV	2,48	0,96	1,0	0,85
sd	3,80	1,54	2,98	4,27

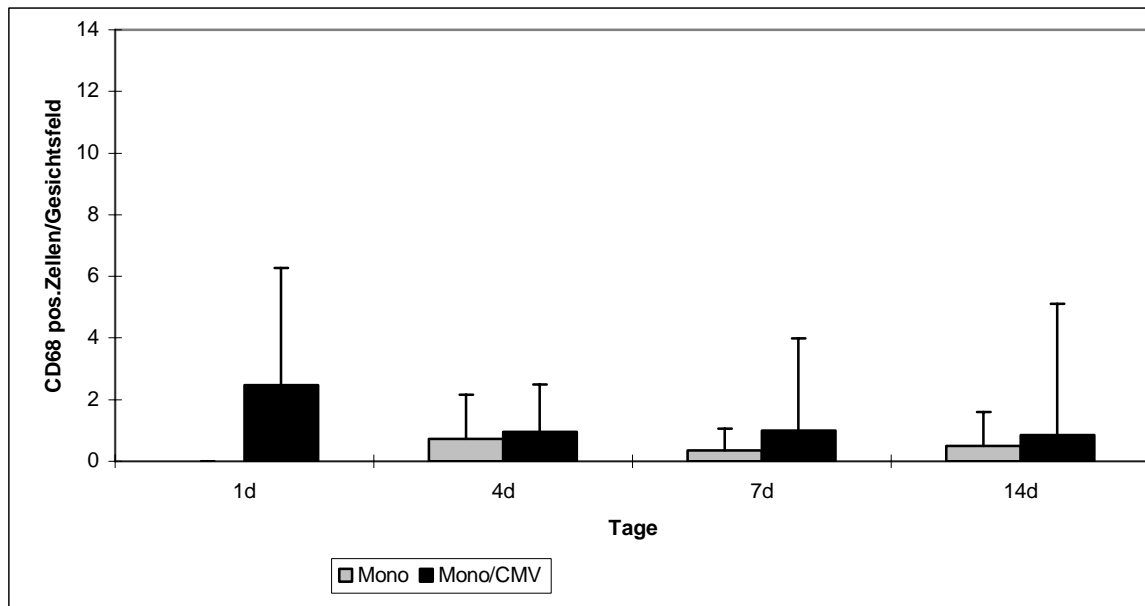


Abb. 5: Darstellung des Migrationsverhaltens infizierter und nicht-infizierter Monozyten

4.3 Proliferationsstudie

Zu den Untersuchungszeitpunkten Tag 1, 4, 7 und 14 werden die Proliferationsraten der HCAEC, wie auch der HCMSMC bestimmt. Hierzu wurde den Kulturen 18h vor Fixierung das Thymidinanalogon BrdU als Markersubstanz zugegeben.

Die Auswertung der Proliferationsrate erfolgt anhand der BrdU-positiven Zellen am Filterquerschnitt, siehe Abbildung 7.

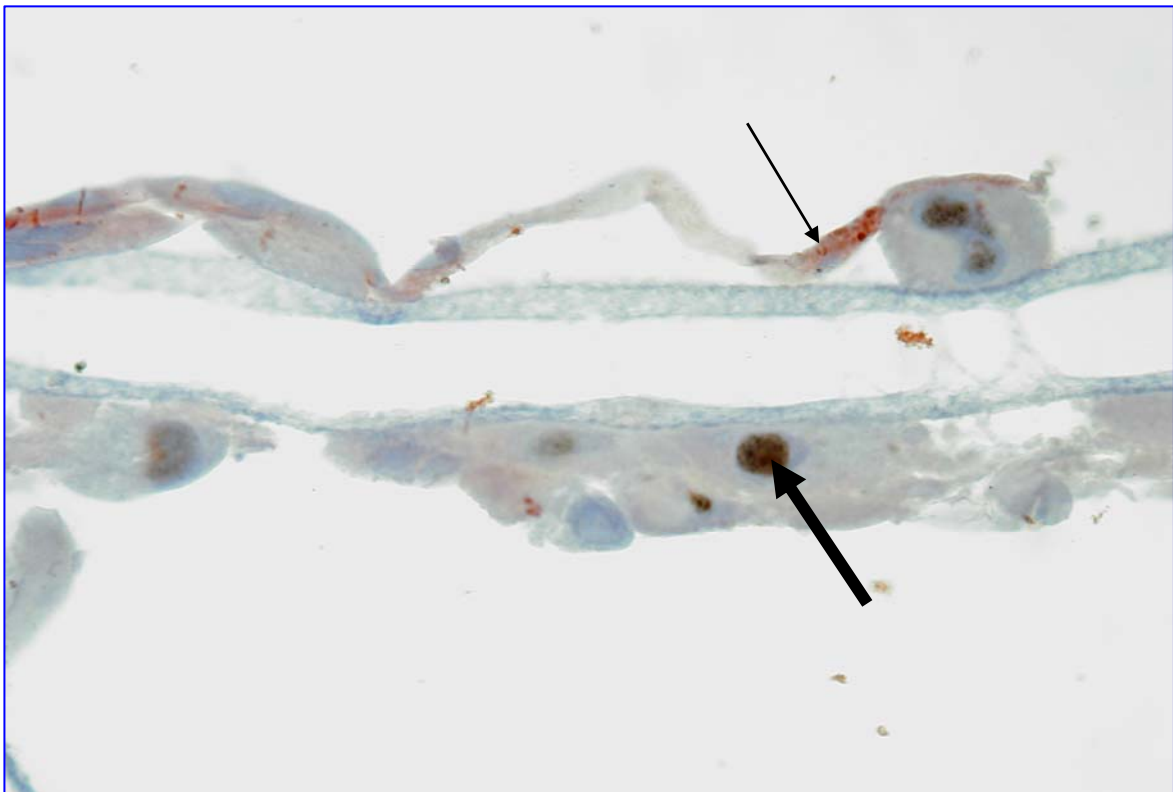


Abb. 7: Filterquerschnitt 14 Tage nach zellbasierter HCMV-Infektion, doppelgefärbt: der dünne Pfeil zeigt eine Endothelzelle, erkennbar an der Färbung von vWF, der dickere Pfeil deutet auf eine glatte Muskelzelle mit BRDU-positivem Zellkern.

4.3.1 Proliferationsverhalten auf der Endothelzell-Seite

Auf der Seite der HCAEC kann zu allen Beobachtungszeitpunkten keine signifikante Steigerung der Proliferationsrate durch eine HCMV-Infektion verzeichnet werden.

Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 5 und Abbildung 8 zusammengefasst.

Tab. 5: Proliferationsrate der Endothelzellen (Prozentualer Anteil der BRDU-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl) an den Untersuchungstagen 1, 4, 7 und 14

	Kontrolle	HCMV (TB40E)	Monozyten	HCMV- inf. Monozyten
1d	0	0	0,46	0,1
sd	0	0	1,41	0,38
4d	0	1,32	0,15	1,0
sd	0	5,75	0,89	5,0
7d	0	0	0	0,59
sd	0	0	0	1,93
14d	0	0	0,04	0,67
sd	0	0	0,24	2,46

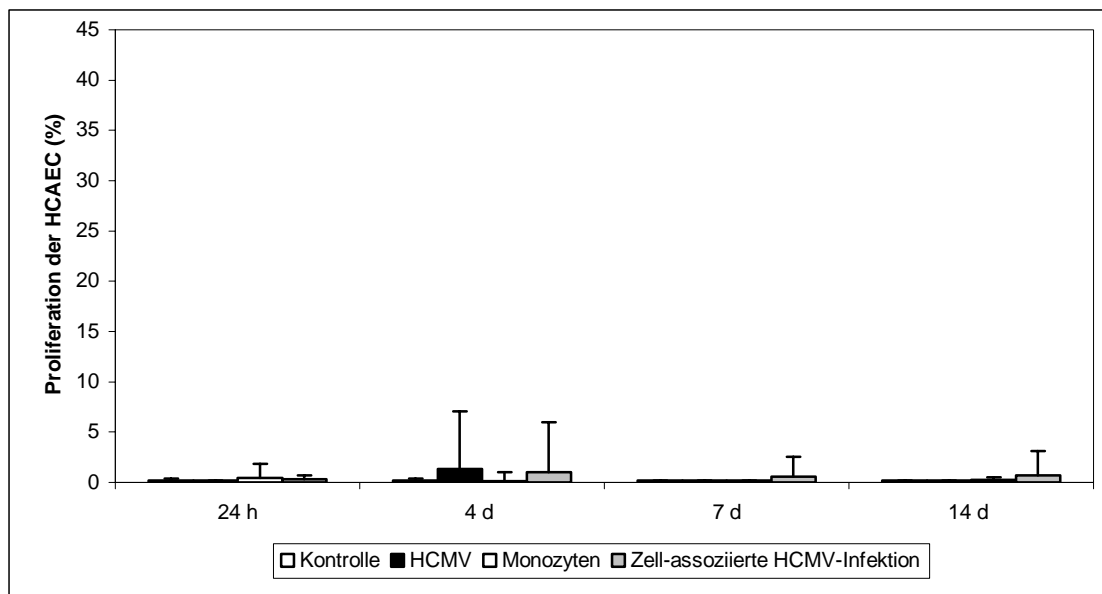


Abb. 8: Darstellung der Proliferationsrate der Endothelzellen nach zellfreier und zellassoziierter HCMV(TB40E)-Infektion sowie unter Einfluss von Monozyten im Verlauf der Zeit.

4.3.2 Proliferationsverhalten auf der Seite der glatten Muskelzellen

Mit Tabelle 6 und Abbildung 9 werden die unterschiedlichen Proliferationsraten der HCMSMC dargestellt.

Zum Untersuchungszeitpunkt Tag 1 divergieren die Proliferationsraten aller Versuchsgruppen nur mäßig. Die Teilungsraten der HCMSMC liegen zwischen $8,42\% \pm 3,98$ (Kontrolle) und $5,13\% \pm 3,73$ (Mono/CMV).

Tab. 6: Proliferationsrate der HCMSMC zu den Untersuchungszeiten 1, 4, 7 und 14 Tage (Prozentualer Anteil der BRDU-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl)

	Kontrolle	HCMV (TB40E)	Monozyten	HCMV- inf. Monozyten
1d	8,42	6,18	6,36	5,13
sd	3,94	3,04	2,66	3,73
4d	0,56	12,2	1,28	1,41
sd	0,78	13,27	1,46	2,69
7d	3,8	30,59	1,5	4,25
sd	3,93	13,78	1,42	3,82
14d	0,39	6,65	0,71	24,11
sd	0,64	10,3	0,79	19,52

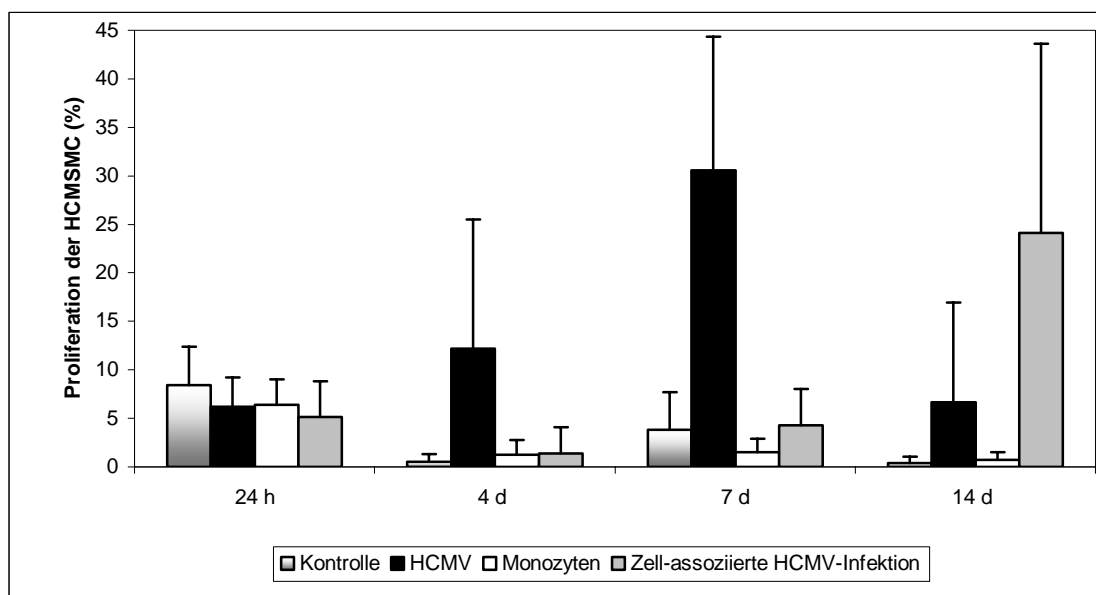


Abb. 9 : Darstellung der Proliferationsrate der glatten Muskelzellen nach zellfreier und zellbasierter HCMV-Infektion und Stimulation mit Monozyten im Verlauf der Zeit.

4.3.2.1 Proliferationsverhalten der nicht-infizierten Kulturen

Im weiteren Verlauf vermindert sich die Zellteilung der HCMSMC bei den nicht-infizierten Kulturen bereits zum Tag 4 hin. So erfolgt bei der Kontrolle mit $0,56\% \pm 0,78$ eine signifikante Minderung der Proliferationsrate auf $6,7\%$ des Ausgangswertes ($8,42\% \pm 3,98$) bei 24 Stunden ($p < 0,001$). Ebenso verhält sich die mit Monozyten versetzte TCK; die Zahl der sich in Teilung befindlichen Zellen fällt auf $1,28\% \pm 1,46$ ab, dies entspricht einer Minderung auf $20,1\%$ des 24-Stundenwertes ($6,36\% \pm 2,66$) ($p < 0,001$). Diese signifikante Verminderung bleibt dann für Kontrollgruppen an den Tagen 7 ($3,8\% \pm 3,93$; $p < 0,001$) und 14 ($0,39\% \pm 0,64$, $p < 0,001$) erhalten, ebenso bleibt auch die Zahl der proliferierenden Zellen in der Monozyten-Gruppe an den Tagen 7 ($1,5\% \pm 1,42$; $p < 0,001$) und 14 ($0,71\% \pm 0,79$, $p < 0,001$) signifikant vermindert.

4.3.2.2 Proliferationsverhalten der infizierten Kulturen

Mit einer Teilungsrate von $12,2\% \pm 13,27$ gegenüber dem 24-Stundenwert lässt sich bei den zellfrei infizierten HCMV-Kulturen eine bereits am Tag 4 um den Faktor 2,0 gesteigerte

Proliferation erkennen, die dann mit einer weiteren Zunahme um den Faktor 4,9 ($p < 0,001$) am Tag 7 statistisch signifikant wird, die Proliferationsrate beträgt dabei $30,59\% \pm 13,78$. Am Tag 14 wird mit einer Teilungsrate von $6,65\% \pm 10,3$ der Ausgangswert wieder annähernd erreicht.

Auch bei der Monozyten-vermittelten Infektion lässt sich eine Zunahme der Proliferation erkennen. Diese erfolgt allerdings gegenüber der zellfreien Infektion verspätet. Hier wird am Tag 4 zunächst, wie bei den nicht-infizierten Kulturen, mit einer Proliferationsrate von $1,41\% \pm 2,65$ eine Reduktion der Teilungsrate auf 27,5% des 24-Stundenwertes beobachtet ($p < 0,001$). Es zeigt sich dann zum Tag 7 wieder eine Zunahme der Proliferationsrate auf 82,8% des Ausgangswertes, zum Beobachtungszeitpunkt 14 Tage wird dann eine Zellteilungsrate von $24,11\% \pm 19,42$ erreicht. Dies entspricht einer signifikanten Steigerung der Proliferationsrate gegenüber dem 24-Stundenwert um den Faktor 4,7 ($p < 0,001$).

5 Diskussion

Eine HCMV-Infektion des Gefäßendothels könnte eine wichtige Rolle bei der Atheroskleroseentwicklung spielen (38). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des HCMV auf humane koronare Zellen in der Co-Kultur untersucht. Es zeigen sich folgende Ergebnisse:

1. Die Monozyten-assoziierte Infektion ist schwächer ausgeprägt und verspätet gegenüber der zellfreien Infektion.
2. Die Adhäsion der HCMV-infizierten Monozyten ist im Vergleich zu den nicht infizierten Monozyten vermindert, jedoch zeigt sich zum frühen Beobachtungszeitpunkt eine gesteigerte Migration infizierter Monozyten.
3. Sowohl nach zellfreier, wie nach zellassoziierter HCMV-Infektion zeigt sich ein signifikanter Anstieg der SMC-Proliferation, jedoch nicht der EC.

I

5.1 Die Transfilter-Co-Kultur

Tiermodelle können in der Erforschung der Zusammenhänge zwischen CMV und Atherosklerose grundlegende und richtungweisende Informationen erbringen. Jedoch braucht es zur genaueren Untersuchung molekularer und zellulärer Mechanismen zusätzliche in vitro Modelle. Zudem machen es die Speziesunterschiede und speziell die Speziespezifität des HCMV notwendig, die Untersuchungen auch an humanen Zellen durchzuführen (39,49). Das hier gewählte Modell der TCK wurde 1998 von Voisard et al. etabliert, um die komplexen zellulären Interaktionen nach Entzündungsreizen speziell zwischen HCMSMC und HCAEC und deren Migrationsverhalten berücksichtigen zu können und dabei der in vivo Situation, einer durch verschiedene Zelllagen geschichteten Gefäßwand, größtmöglich gerecht zu werden (53). Mit diesem TCK Modell konnte eine nach Monozytenzugabe gesteigerte Proliferationsrate der HCMSMC beobachtet werden (58), wodurch es sich auch als vergleichendes Modell gegenüber anderen Entzündungsreizen eignet und in dieser Arbeit in den Aspekten Adhäsion, Migration und Proliferation die zellfreie der Monozyten-assoziierte Infektion gegenüberstellt.

Trotz der durch die Ko-Kultivierung erreichte Annäherung an die in vivo Situation, werden z.B. der Einfluß der Adventitia oder aber des Immunsystems im TCK-Modell nicht berücksichtigt.

5.2 Infektion

Das HCMV Virus wird in vivo durch Körperflüssigkeiten übertragen und führt beim immunologisch Gesunden in der Regel, abgesehen von einigen mononukleoseähnlichen Verläufen, nicht zu Krankheitserscheinungen. Jedoch verbleibt das Herpesvirus latent in CD33⁺/CD34⁺-Vorläuferzellen der Monozyten und in Endothelzellen und kann unter Immunsuppression reaktiviert werden. Die Infektion der Endothelzellen unterstützt oder verursacht mit zunehmender Wahrscheinlichkeit die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen, sei es im Status der Latenz oder durch Phasen geringer Replikation des Virus. Eine Schlüsselrolle in der systemischen Verbreitung des Virus während der Primärinfektion und nach Reaktivierung spielen die Monozyten (12,38,48). Guetta et al. zeigten, dass bei jeweils mit infizierten Monozyten kultivierten ECs und SMCs 7 bis 14 Tage nach Beginn der Ko-Kultivierung zytopathische Effekte als Zeichen der Infektion nachweisbar sind (19). In der vorliegenden Studie wurden mit der zellfreien und der Monozyten-assoziierten Infektion zwei Möglichkeiten zur Infektion unter Co-Kultur-Bedingungen untersucht. Beide Methoden waren geeignet zur Infektion von HCAEC und HCMSMC. Dabei war die monozytenbasierte HCMV-Infektion schwächer ausgeprägt und verspätet im Vergleich zur zellfreien Infektion. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die geringere Virusdosis bei Zugabe infizierter MC gegenüber der Infektion mit freiem Virus. Eine sehr wahrscheinliche Ursache für die verzögerte Infektion kann allerdings sein, dass periphere Monozyten lediglich dem Virustransport dienen, dieses sich aber erst nach deren Differenzierung zu Makrophagen replizieren kann. Smith et al. beschreiben, in auf Fibronectin kultivierten MC, eine durch das HCMV-Virus verstärkte Expression von CD68 und Human leukocyte-associated antigen-DR (HLA-DR). Diese Marker werden bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen vermehrt exprimiert und 96h bis 14 Tage nach Infektion verstärkt nachgewiesen. Die Virusproduktion in den Makrophagen setzt dann in größeren Mengen erst ab der dritten Woche nach Infektion ein (42). Takahashi et al. geben für die Differenzierung von MC in Makrophagen nach Adhäsion einen Zeitraum von 2 Tagen an (50). Fish et al. berichten über eine bei Makrophagen verspätet einsetzende Virusreplikation, gegenüber der in Fibroblasten. Sie weisen nach

Infektion von bereits differenzierten Makrophagen erhöhte Transkriptionsraten an den Tagen 3 und 7 p.i. nach, während infizierte Fibroblasten von 24 Stunden p.i. an kontinuierlich ansteigende und sehr viel früher nachweisbare IE-Antigene aufweisen (15). Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass, unter Einbeziehung der Zeit für die Differenzierung der MC und dem Einsetzen der Virusreplikation in den Makrophagen, eine längere Laufzeit der TCK-Versuche bei der Versuchsgruppe mit monozytenbasierter Infektion der Tendenz entsprechend zu einem weiteren Anstieg der Infektionsrate führen könnte. Da in den vorliegenden Monozyten-assoziierten Versuchen bereits nach 14 Tagen eine Infektion nachweisbar ist (entsprechend einer Verzögerung um sieben Tage gegenüber der zellfreien Infektion), ist ein die Differenzierung und Virusreplikation beschleunigendes Moment durch die Interaktion von MCs mit HCAEC und HCMSMC denkbar. Hierzu berichten Guetta et al. über eine verstärkte Aktivierung des major immediate early promotor-Gens (MIEP) in mit CMV infizierten Monozyten 48 Stunden nach Ko-Kultivierung mit EC oder SMC (19). Den Einfluss der von den MC adhären Matrix auf die Virusreplikation verdeutlicht ebenso die bis fünf Wochen nach Infektion noch nicht eingesetzte Virusproduktion in MC auf Kollagen, gegenüber einer Replikation drei Wochen nach Infektion in MC auf Fibronectin (42).

5.3 Adhäsion und Migration

Das Gefäßendothel wird durch die unterschiedlichsten Faktoren, darunter auch durch Infektion mit HCMV (7) zu einer verstärkten Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen veranlasst. P-selectine, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) werden auf geschädigtem Endothel zur Adhäsion von Blutmonozyten exprimiert, die dann nach Migration mit Hilfe von platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 PECAM-1, junctional adhesion molecules (JAM1-3), Occludin, Cadherinen und unter dem Einfluß von Cytokinen wie dem MCP-1 in die Intima migrieren, dort zu Makrophagen differenzieren und proinflammatorisch wirken (1,12,50). Die Makrophagen zeigen korrespondierend Rezeptoren der β -2 Integrinfamilie, des β -1 Integrin VLA-4, PECAM-1, JAM und anderer Moleküle, die diesen engen Zellkontakt seitens der MC ermöglichen (1,30).

In dieser Studie werden Adhäsions- und Migrationsverhaltens von HCMV-infizierten MC mit denen nicht-infizierter MC im Rahmen der Co-Kultur verglichen. Es zeigt sich über den gesamten Untersuchungszeitraum eine deutlich verminderte Adhäsion der infizierten

MC gegenüber den nicht infizierten, dabei lässt sich während des Beobachtungszeitraumes bei der Anzahl der adhärierenden MC fast keine Veränderung feststellen. Eine verstärkte Migrationsbewegung lässt sich einzig zum ersten Beobachtungszeitpunkt nach 24 Stunden bei den infizierten MC erkennen.

Smith et al. finden in ihren Versuchen an Monolayern von Humanen dermalen mikrovasculären Endothelzellen (HMEC) auf Filtern mit 8µm Poren vergleichbare Ergebnisse. Sie vergleichen die Anzahl der stationären MC gegenüber der von denen, die auf die Filterunterseite migriert waren. Dabei zeigen sich nach 24 Stunden für infizierte MC eine geringere Adhäsion auf der EC-Seite und eine verstärkte Migration durch die Endothelzellschicht. Nach 96 Stunden lassen sich weiterhin an die Filterunterseite adhärierende MC feststellen. Ebenfalls nach 96 h quantifizieren Smith et al. die an den Boden der Kulturschalen adhärierenden Monozyten, dabei stellen sie auch hier bestätigend fest, dass 70% der infizierten MC versus 25% der nicht-infizierten MC vollständig migriert waren (42). Es ist anzunehmen, dass für die Beobachtung von Adhäsion und Migration vor allem der Zeitraum bis 24 Stunden genauere Ergebnisse liefern kann. Die Monozyten benötigen nach Takahashi et al. von ihrer Produktion im Knochenmark bis zu ihrer Migration in peripheres Gewebe lediglich drei Tage, zwei weitere für ihre Differenzierung in Makrophagen und möglichen Umwandlung in Schaumzellen (50). Meerschaert und Furie berichten bei ihren Versuchen zur Migration von MC, mit auf Amnion-Zellen kultivierten HUVEC, von einer Adhäsion von 50% der zugegebenen MC auf nicht-stimulierten Endothelzellen bereits nach 20 min und von einer maximalen Migration von etwa 50% der zugegebenen MC nach 2 Stunden (30), dies entspricht einem Zeitraum der in der vorliegenden Versuchsreihe nicht erfasst ist. Allerdings liegt bei Meerschaert und Furie gegenüber der TCK eine andere Kultivierung von Endothelzellen mit direktem Kontakt zum darunter liegenden nicht-vaskulären Gewebe ohne Filter vor. Voisard et al. berichtet speziell für die TCK, dass im Verhältnis zu den, zur ICAM-1 Expression mit TNF- α vorbehandelten und auf HCAEC adhärierenden MC nur bis zu 20% auf die HCMSMC-Seite migrieren, dies allerdings bereits schon wenige Stunden nach Aussaat (58). Beurteilt werden dabei ebenfalls nur die, an die Filterunterseite adhärierenden MC, die am Boden der TCK-Schale anhaftenden werden nicht beurteilt.

Interessanterweise zeigen die mit UV-inaktiviertem Virus behandelten MC ein vergleichbares Adhäsions- u. Migrationsverhalten, was darauf hinweist, dass die Mechanismen der Adhäsion und Migration unabhängig von der viralen Genexpression sind

und allein auf durch den Viruskontakt bedingte zelluläre Veränderungen zurückführbar sind. Diese Vermutung stützend, weisen Smith et al. neben migrationsfördernden HCMV induzierten morphologischen Veränderungen, auch solche auf molekularer Ebene nach. So berichten sie über eine gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls β_1 -Integrin, dem Liganden des VCAM-1 und der zur Überwindung von gap junctions behilflichen Transmembranproteine Occludin und ZO-1 in infizierten MC nach 24 und 48 Stunden. Sie konnten zeigen, dass diese vermehrte transendotheliale Motilität auch über eine vermehrte Aktivität der Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphat Kinase (PI(3)K) vermittelt wird (41,42). In einer Arbeit von Yurochko und Huang wird nachgewiesen, dass die HCMV Infektion in MC zu einer verstärkten Produktion und Freisetzung von IL-1 β führt. Diese Reaktion wird über eine HCMV induzierte Translokation von NF κ B in den Zellkern vermittelt (60). Endothelzellen wiederum reagieren mittels IL-1 β auf eine HCMV Infektion mit einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen. Dengler et al. zeigen, dass IL-1 β nicht nur autokrin, sondern auch parakrin wirkt und somit auch auf nicht infizierten Endothelzellen die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-selectin bewirkt (9). Die von Yurochko und Huang berichtete Freisetzung von IL-1 β durch HCMV-infizierte MC könnte somit als Triggersubstanz eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen bewirken.

Auffällig bei vorliegender Arbeit sind die über den gesamten Beobachtungszeitraum annähernd konstanten Adhäsionsraten. In vivo werden nicht adhärierende MC durch den Blutfluß wegbefördert. Auch in vorliegendem Versuch ist die Adhäsion der MC durch regelmäßigen Mediumwechsel nicht beeinträchtigt, was auf eine feste und über 14 Tage beständige Adhäsion oder aber eine Integration in den Zellverband der Endothelzellschicht schließen lässt. Ohne Stimulation, z.B. induziert durch Adhäsion würden die Monozyten der Apoptose unterliegen (16). Durch die Fluoreszenzaufsicht ist nicht geklärt, ob die Zellen an der Oberfläche der Endothelzellen anhaften, nach subendothelial einwandern, ohne den Filter zu passieren, oder aber wieder in Richtung Endothelzell-Oberfläche zurück migrieren. Die Differenzierung zu Makrophagen bewahrt MC vor dem Zelltod (50). Sehr wahrscheinlich ist demnach, dass hier die MC in der Tat eine Differenzierung zu Makrophagen oder aber zu vaskulären Dendritischen Zellen durchlaufen. Muller und Randolph beschreiben, dass in vitro 50% der zunächst transmigrierten MC innerhalb von zwei Tagen ihre Migrationsrichtung umkehren. Es handelt sich bei diesen Zellen um Dendritische Zellen, während es sich bei den definitiv eingewanderten Zellen um

Makrophagen handelt (34). Bobryshev beschreibt mehrere Entwicklungswege von unreifen vaskulären Dendritischen Zellen, darunter auch einer lokal im Gefäß stattfindenden Differenzierung aus CD34⁺ Vorläuferzellen (3). Bei hier vorliegenden Adhäsionsstudien lassen sich auf der Endothelzelleseite deutlich mehr nicht-infizierte wie infizierte MC ausmachen. Unter der oben diskutierten Voraussetzung, dass MC aufgrund der Infektion mit HCMV sehr viel schneller zu Makrophagen differenzieren und das HCMV-Virus die Motilität fördert (42), unterliegen HCMV-infizierte MC einer höheren Migrationsrate durch den Filter. Eine Verschiebung des Gleichgewichts bei der Differenzierung von Monozyten zugunsten von Makrophagen und einer Blockade der Differenzierung zu Dendritischen Zellen unter dem Einfluss von IL-10 wird von Allavena beschrieben (2). Gredmark und Söderberg-Nauclér finden in HCMV infizierten MC eine Steigerung der Cytokinproduktion von IL-1 β , IL-6 und IL-10. In ihren Versuchen zur Monozyten-Differenzierung weisen sie unter IL-10 ebenfalls eine geringere Differenzierungsrate nach. Für mit HCMV infizierte Monozyten beobachten sie eine, von der Menge des Virus abhängige Verhinderung der Weiterentwicklung der MC zu Dendritischen Zellen. Dies scheint direkt durch das Virus und nicht durch dessen Genprodukte induziert zu sein. Damit würde das Virus die zentrale Rolle der Dendritischen Zellen als Antigen präsentierende Zelle und Initiator der T-Zellantwort unterlaufen. In einem Migrationsversuch findet sich für infizierte MC im Vergleich zu bereits differenzierten Dendritischen Zellen nach 2 Stunden eine geringere Migrationsrate durch Endothel auf Filter (17). Hierbei werden allerdings bereits zu einem sehr frühen Beobachtungszeitpunkt undifferenzierte MC mit differenzierten Zellen verglichen. Somit sind diese Daten nicht generell im Widerspruch zu den von Smith et al. nach 24 Stunden gewonnenen und oben diskutierten Ergebnissen zu sehen.

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur lässt sich für Adhäsion und Migration eine durch das HCMV verhältnismäßig schnellere und ausgeprägtere Differenzierungsrate von Monozyten zu Makrophagen und eine höhere Migrationsrate durch Filter und SMC-Zellschicht postulieren. Um dieses genauer zu untersuchen, wäre eine differenzierte Betrachtung im Zeitraum von 24 Stunden sinnvoll, da die Prozesse der Adhäsion und Migration bereits in dieser frühen Phase ablaufen.

5.4 Proliferation

In vivo kann eine Verletzung der Gefäßwand eine Entzündungsreaktion hervorrufen, in deren Kontext es zu einer gesteigerten Produktion von Chemokinen und Wachstumsfaktoren kommt, welche die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen fördern (40).

In der vorliegenden Arbeit wird das reaktive Proliferationsverhalten glatter Muskelzellen unter dem Einfluss der HCMV-Infektion unter Co-Kulturbedingungen untersucht. Dabei zeigt sich, wie von unserer Arbeitsgruppe bereits berichtet (54,55), für beide Infektionswege, der monozytenbasierten und der zellfreien Infektion eine signifikante Stimulation der Proliferationsrate koronarer glatter Muskelzellen, wobei die Proliferation bei der monozytenbasierten Infektion verspätet einsetzt, wie dies auch schon für den Nachweis der Infektion der Fall war. Die Proliferationssteigerung lässt sich bereits einige Tage vor der Infektion nachweisen. Sie erreicht für die zellfreie Infektion am Tag 7 das 4,9-fache und für die monozytenbasierte Infektion am Tag 14 das 4,7-fache des Ausgangswertes, während nicht-infizierte Kulturen eine gegenüber dem 24 h-Wert stark rückläufige Proliferationsrate aufweisen.

Diese Ergebnisse überraschen insofern, dass bei Untersuchungen zur Proliferation am HCMV-infizierten humanen Organkulturmodell renaler Arterien eine verzögerte, nicht aber eine verstärkte proliferative Aktivität nachweisbar ist. Zudem verringert sich in diesem Modell längerfristig die neointimale Hyperplasie gegenüber der Kontrolle (56,57). Klinischen Studien berichten sowohl über eine Korrelation zwischen hohen Serumtitern an HCMV-IgG und Restenoseentwicklung nach Koronarangioplastie (32,62), als auch über keinerlei Verbindung zwischen einer vormaligen Exposition mit HCMV und Restenose (36,52). Mit der Bestimmung der Seropositivität wird allerdings lediglich die Exposition zum Virus nachgewiesen, eine Latenz in der Gefäßwand ist jedoch damit nicht bedingt, so dass in diesem Fall auch keine Reaktivierung erfolgen kann. Horváth et al. zeigen ebenfalls, dass über die Serologie keine Rückschlüsse auf HCMV-DNA in der Gefäßwand gewonnen werden können, zumal deren Patientenkollektiv eine hohe Durchseuchungsrate aufweist. Sie berichten jedoch über eine deutliche Korrelation zwischen dem Vorhandensein von viraler DNA in der menschlichen Aorta und der Häufigkeit des Auftretens ischämischer Herzerkrankungen (21). Einige Untersuchungen am Tiermodell deuten ebenfalls auf einen proliferationssteigernden Effekt des CMV hin. So erhöht sich in Apolipoprotein-E knockout Mäusen die Zahl der atherosklerotischen Läsionen, wenn diese

mit dem mausspezifischen CMV infiziert sind (22). Ebenso zeigen Ratten, denen über einen viralen Vektor IE-Gene transferiert wurde, bereits nach 14 Tagen vaskuläre Defekte in Form von neointimalen Läsionen (59). Infizierte Ratten fielen nach MHC-I inkongruenten Transplantationen der Aorta durch eine verstärkte Abstoßungsreaktion auf (27). Auf zellulärer Ebene wird bei Versuchen an humanen Fibroblasten von einer HCMV induzierten Blockierung des Zellzyklus in der späten G1-Phase berichtet (4,11,29). Dagegen finden Murphy et al. eine Blockierung des Zellzyklus nach Progression und Eintritt in die S-Phase durch IE2-86, dies gelte für alle Zellen, die die Virusreplikation ermöglichen, so auch für SMC (35). Ebenso berichten Castillo et al. bei Maus-Fibroblasten von einem durch HCMV IE-Antigene vermittelten Eintritt von ruhenden Zellen in die S- und damit in die Proliferationsphase und der Verhinderung des Ausstiegs aus dem Zellzyklus (G0). Sie beschreiben diese Entwicklung vermittelt durch die Expression von IE2-86. Gleiches gilt für IE1-72, hier jedoch unter der Voraussetzung, dass die Zelle nicht das Apoptoseprotein p53 enthält. Unter der im Versuch isolierten Expression von IE1-72, wird sogar ein erhöhter p53-Level erreicht, der zum Zellarrest oder zur Apoptose führen kann (8). In SMC wirkt allerdings das gleichzeitig exprimierte IE2-86 der vermehrten Produktion von p53 entgegen und führt damit zu einer Ansammlung nicht dem Zelltod unterliegenden SMC (45,51).

Ein weiterer Schritt zur DNA-Replikation wird durch die Bindung von IE1-72 an p107, einem Cdk2-Kinasesuppressor ermöglicht, da dies zur Freisetzung der cyclin E/cdk2 Kinase führt (25,37,61). Von IE2-86 wird berichtet, sowohl über die Bindung eines zweiten pocket proteins pRb (25), als auch durch direkte Interaktion mit dem cyclin E Promotoren die cyclin dependent kinase 2 (cdk2) zu aktivieren (4).

Bei Exposition von SMC mit CMV steigen nach Dhaunsi die NADPH Oxidase und mit ihr die Serum-induzierte DNA-Synthese (Nachweis über BrdU-Aufnahme) in SMC deutlich an. Diese Veränderungen auf die SMC-Replikation bleiben bei Blockierung der NADPH-Oxidase aus (10). NADPH-Oxidasen sind Hauptproduzenten von reactive oxygen species (ROS). ROS aktivieren das zur Transskription führende NF κ B und sind somit wichtig für physiologische Wachstums- und Migrationsvorgänge und für pathologische Prozesse wie unkontrolliertes Zellwachstum und Entzündungsprozesse, wie sie der Atherosklerose-entwicklung zugrunde liegen (18,46). Speir et al. zeigen, dass der Anstieg von ROS unter CMV Infektion zumindest zu einem Teil über die cdK2 vermittelt wird und mit Cyclooxygenasehemmern wie Aspirin verhindert werden kann (46).

Auch beschreiben Jiang et al., ebenfalls induziert durch das IE1-Protein, eine Aktivierung von Rel B-p50 einer Untereinheit des NF κ B, welche über E8-CAT die Expression von c-myc Promotoren vermittelt. Dieser Transkriptionsfaktor vermittelt den Eintritt der SMC in die S-Phase (24).

Auch wenn die S-Phase erreicht wird und zelluläre und virale DNA repliziert werden, finden Jault et al. in Fibroblasten einen Stillstand in G2/M, wodurch eine Anhäufung eines mehrfachen Chromosomensatzes ohne die Fähigkeit zur Zellteilung in der Mitose verursacht wird (23). Die Progression der Zelle in die S-Phase mit Induktion von S-Phasengenen, die verlängerte Dauer des Zellzyklus und die Verhinderung der Apoptose bieten zumindest für die Virusreplikation des HCMV optimale Voraussetzungen (8,51).

Welche Rolle das CMV auf die zelluläre DNA und folglich auf die Proliferation ausübt, ist nicht eindeutig geklärt. So ist bei den gefundenen Ergebnissen dieser Arbeit denkbar, dass es sich bei den durch ihren BrdU-Einbau markierten und prozentual erfassten Zellen um Zellen handelt, die wie oben beschrieben zwar zur Replikation zellulärer DNA fähig sind, jedoch durch unvollständige Mitose keine Zellteilung und damit „echte Proliferation“ erreichen. Jedoch muss bei Vorliegen der widersprüchlichen Datenlage aus klinischen Studien und der Hinweise auf Einflüsse des CMV auf die Atheroskleroseentstehung in tierexperimentellen Untersuchungen nach weiteren Faktoren gesucht werden, die die Proliferation der SMC und damit die Entwicklung der Atherosklerose mit beeinflussen und vorantreiben können. So zeigen Yonemitsu et al. einen Einfluss von auf EC transferiertem immediate early Gen auf die Zellproliferation boviner SMC, indem sie das Medium solcher ECs auf einer Kultur von SMC ausbringen. Dabei können sie sowohl eine erhöhte Aufnahme von Thymidin durch die Zellen, als auch eine erhöhte Zellzahl der SMC beobachten. Dies würde bedeuten, dass die Genexpression des CMV-IE Gens in ECs die Produktion von Substanzen veranlasst, die auf das Wachstum der glatten Muskelzellen wirken. Dabei zeigen in SMC transferierte IE-Gene alleine nach 5 Tagen keinen Effekt auf deren Proliferation. Jedoch steigert ihr Vorhandensein in SMC die Stimulation des Wachstums durch basic fibroblast growth factor (bFGF) (59). Auch andere Wachstumsfaktoren haben Einfluss auf das Wachstumsverhalten von SMC. So auch PDGF-BB, der auch von ECs gebildet wird. Guetta et al. konnten in ECs eine durch IE1-72 gesteigerte Produktion von PDGF Promotoraktivität zeigen. Eine vermehrte Sekretion von PDGF durch ECs aufgrund einer CMV Infektion konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden (20). In einem Modell einer abortiven Infektion von Ratten-SMC

mit humanem CMV wird das Rezeptorprotein PDGF β durch das IE-Genprodukt früher und bis zum Tag 5 nach Infektion gegenüber der Kontrollgruppe in verstärktem Maße exprimiert. Bei Zugabe des Wachstumsfaktors PDGF auf infizierte SMC zeigt sich dementsprechend eine verstärkte reaktive Migration der Zellen. Die infizierten Zellen zeigen zudem, ab dem siebten Tag nach Infektion beginnend, eine stärkere Proliferation als nicht-infizierte SMC (quantitativ erfasst anhand der absoluten Zellzahl) (63).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die abortive Infektion und mit ihr die isolierte Expression der IE-Gene einen direkten Einfluss auf die DNA-Replikation glatter Muskelzellen ausübt. So erhöht die abortive Infektion zudem durch Modifikationen in der Rezeptordichte die Empfindlichkeit der SMCs auf chemotaktische Signale oder kann durch Veränderungen der intrazellulären Stoffwechselsituation in ECs und der dabei entstehenden Stoffwechselprodukte Einfluss auf das Proliferationsverhalten der SMC nehmen.

Abschliessend kann bei den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen zur Proliferation aufgrund der Methodik nicht eindeutig zwischen einer tatsächlichen Proliferation oder einer Produktion sowohl von viraler, als auch zellulärer DNA ohne anschließende vollständige Mitose differenziert werden. Jedoch lässt sich bei vorliegenden Untersuchungen eine Infektion der HCMSMC erst nach Einsetzen der Proliferation nachweisen. Dies spricht für die These, dass beim Nachweis der Proliferation durch den prozentualen Anteil an BrdU-positiven Zellen durchaus zelluläre DNA erfasst wird, die Frage der Zellteilung bleibt jedoch ungeklärt. Die früh einsetzende Replikation zellulärer DNA von HCMSMCs ist möglicherweise durch den stimulierenden chemotaktischen Einfluss der co-kultivierten infizierten ECs mitbegründet.

5.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit, wie die Daten aus der Literatur, zeigen die Fähigkeit des HCMV auf, die infizierte Zelle an multiplen Angriffspunkten zu beeinflussen und dabei auch wesentlich Einfluss auf die inter- und intrazelluläre Kommunikation und den Zellzyklus zu nehmen. Dies wird sowohl im Hinblick auf die Ergebnisse der Adhäsions- und Migrations-Studie, die auf eine erhöhte Migrationsrate von infizierten Monozyten hinweisen, als auch auf die Proliferationsstudie, die eine deutliche Steigerung der Replikation zellulärer DNA in SMC nach Infektion aufzeigt, deutlich. Dabei beeinflusst das Virus unterschiedlichste zelluläre Prozesse, um damit seine Verteilung im Gewebe und seine eigene Replikation zu unterstützen. Auswirkungen auf die Entstehung einer

Atherosklerose sind dabei vor allem durch die Beeinflussung des Migrationsverhaltens von MC und die Steigerung der Replikation zellulärer DNA mit noch unklaren Einflüssen auf die, an der Zellteilung gemessenen tatsächlichen Proliferation und der Verhinderung der Apoptose zu erwarten. Die TCK ist eine geeignete Methode, um die durch das HCMV sehr wahrscheinlich mitbegründete Pathogenese der Atherosklerose im Hinblick auf die viral veränderten zellulären Interaktionen zwischen HCMSMC und HCAEC zu untersuchen. Trotz seiner Komplexität ist das TCK-Modell ein *in vitro* Verfahren und kann damit nur begrenzte Gesichtspunkte erfassen. Mit Hinblick auf die Speziespezifität des HCMV bleiben *in vitro* Versuche an humanen Zellen, neben serologischen Verfahren und Versuchen am Tier unabdingbare Hilfsmittel, um unser Bild über Auswirkungen der HCMV-Infektion auf die Atheroskleroseentwicklung zu komplettieren. In diesem Rahmen ist die TCK ein probates Mittel, um interzelluläre Vorgänge zu erfassen.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Die Hinweise verdichten sich, dass die chronische Zytomegalievirus-Infektion einen Einfluss auf die Atheroskleroseentwicklung haben könnte. Mit dieser Arbeit soll der Einfluss des humanen Zytomegalievirus (HCMV) auf die Proliferation von humanen koronaren glatten Muskelzellen (HCMSMC) speziell unter den Bedingungen der Co-Kultur mit zugleich infizierten humanen koronaren Endothelzellen (HCAEC) untersucht werden. Zudem wird der Infizierbarkeit von Zellen der Gefäßwand mittels direkten Viruskontakt, oder aber mittels einer Monozyten-assoziierten Infektion beleuchtet, wonach gemäß einer gängigen Vektortheorie, den Blutmonozyten die Distribution von CMV zugeschrieben wird. Weiterhin wird die Auswirkung der Monozyten-Infektion auf das Migrations- und Adhäsionsverhalten der Monozyten erarbeitet.

Methodik: Das Transfilter Co-Kultur (TCK) Modell mit HCMSMC und HCAEC imitiert die Gefäßinnenwand. Dabei werden beide Zellarten analog der Lamina Elastica Interna durch einen kollagenbeschichteten porösen Polykarbonatfilter (Porengröße: 5µm) voneinander getrennt. Dieses Modell erlaubt damit die Untersuchung komplexer Interaktionen der beiden Zellarten, wie sie in vivo stattfinden. Nach zweiwöchiger Co-Kultivierung erfolgt die Zugabe von Monozyten (MC), von mit humanem Zytomegalievirus infizierten MC und einer Virussuspension in der Konzentration MOI 10. Die Kulturen wurden 24 Stunden, 4, 7 und 14 Tage nach Infektion fixiert und für die Fragestellung der Infektion, Adhäsion und Migration mittels Fluoreszenzfärbung in der Filteraufsicht und in Fragen der Proliferation mittels ihres Bromdesoxyuridin-Einbaus am Filterquerschnitt ausgewertet.

Ergebnisse:

1. Infektion: Die Monozyten-basierte Infektion erfolgte in HCAEC wie in HCMSMC gegenüber der zellfreien Infektion mit 7-tägiger Verspätung und war im gesamten Beobachtungszeitraum schwächer ausgeprägt.

2. Adhäsion und Migration: Es zeigt sich eine über den zweiwöchigen Beobachtungszeitraum gleichbleibende, jedoch für die infizierten MC verminderte Adhäsionsrate. Zum Beobachtungszeitpunkt 24 Stunden lässt sich eine signifikant gesteigerte Migration der infizierten MC feststellen.
3. Proliferation: Die Replikation der HCMSMC zeigt eine deutliche und signifikante Steigerung auf das 4,9-fache bei der zellfreien Infektion und mit zeitlicher Verzögerung auf das 4,7-fache des Ausgangswertes ebenfalls bei der Monozyten-assoziierten Infektion. Dabei geht die Replikationssteigerung der Nachweisbarkeit der Infektion mit HCMV anhand des Late-Antigens voraus.

Schlussfolgerung: Diese Studie beobachtet die Auswirkungen einer Zytomegalievirus-Infektion auf die reaktive Proliferation glatter Muskelzellen und das Adhäsions- und Migrationsverhalten zugegebener Monozyten.

Eine Infektion der Zellkultur lässt sich sowohl über die Zugabe des Virus, als auch durch eine Infektion der Monozyten erzielen. Dabei zeigen infizierte Monozyten innerhalb der ersten 24 Stunden eine verstärkte Migrationsbewegung durch den Filter, während nicht-infizierte Monozyten in größerer Zahl auf der Seite der Endothelzellen adhären bleiben. Zudem führt die Infektion zu einer deutlichen Steigerung der Replikation zellulärer DNA; inwieweit jedoch diese vermehrte Replikation in der tatsächlichen Zellteilung mündet, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Die vermehrte monozytäre Migration und die verstärkte Replikation glatter Muskelzellen zeigen das deutlich atherogene Potential des humanen Zytomegalievirus.

7 Literaturverzeichnis

1. Alexander JS, Elrod JW, Park JH: Roles of leukocyte and immune cell junctional proteins. *Microcirculation* 8: 169-179 (2001).
2. Allavena P, Piemaonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A: IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 28: 359-369 (1998).
3. Bobryshev YV: Dendritic cells and their involvement in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11: 511-517 (2000).
4. Bresnahan WA, Albrecht T, Thompson EA: The cyclin E promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kDa immediate early protein. *J Biol Chem* 273: 22075-22082 (1998).
5. Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T: Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* 224: 150-160 (1996).
6. Bruggeman CA: Does Cytomegalovirus play a role in atherosclerosis? *Herpes* 7: 51-54 (2000).
7. Burns L, Pooley JC, Walsh DJ, Vercellotti GM, Weber ML: Intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells is activated by cytomegalovirus immediate early proteins. *Transplantation* 67: 137-144 (1999).
8. Castillo JP, Yurochko AD, Kowalik TF: Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. *J Virol*. 74: 8028-8037 (2000).
9. Dengler T, Raftery M, Werle M, Zimmermann R, Schönrich G: Cytomegalovirus Infection of vascular cells induces expression of pro-inflammatory adhesion molecules by paracrine action of secreted interleukin-1 β . *Transplantation* 69: 1160-1168 (2000).
10. Dhaunsi GS, Kaur J, Turner RB: Role of NADPH oxidase in cytomegalovirus-induced proliferation of human coronary artery smooth muscle cells. *J Biomed Sci*. 10: 505-509 (2003).
11. Dittmer D, Mocarski ES: Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J Virol* 71: 1629-1634 (1997).

12. Epstein SE, Zhou YF, Zhu J: Infection and atherosclerosis – emerging mechanistic paradigms. *Circulation* 100: 20-28 (1999).
13. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, Bickel C, Kopp H, Rippin G, Victor A, Hafner G, Schlumberger W, Meyer J: Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis. *Circulation* 105: 15-21 (2002).
14. Fabricant CG, Fabricant J, Litrenta MM, Minick CR: Virus-induced atherosclerosis. *J Exp Med* 148: 335-340 (1978).
15. Fish KN, Depto AS, Moses AV, Britt W, Nelson JA: Growth kinetics of human cytomegalovirus are altered in monocyte-derived macrophages. *J Virol*. 69: 3737-3743 (1995).
16. Flad HD, Grage-Griebenow E, Petersen F, Scheuerer B, Brandt E, Baran J, Pryjma J, Ernst M: The role of cytokines in monocyte apoptosis. *Pathobiology* 67:291-293 (1999).
17. Gredmark S, Söderberg-Nauclér C: Human cytomegalovirus inhibits differentiation of monocytes into dendritic cells with the consequence of depressed immunological functions. *J Virol* 77: 10943-10956 (2003).
18. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD(P)H Oxidase - Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: 494-501 (2000).
19. Guetta E, Guetta V, Shibutani T, Epstein SE: Monocytes harboring cytomegalovirus: Interaction with endothelial cells, smooth muscle cells, and oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res* 81: 8-16 (1997).
20. Guetta E, Scarpati EM, DiCorleto PE: Effect of cytomegalovirus immediate early gene products on endothelial cell gene activity. *Cardiovasc Res* 50: 538-546 (2001).
21. Horváth R, Cerný J, Benedík J jr., Hökl J, Jelínková I, Benedík J: The possible role of human Cytomegalovirus (HCMV) in the origin of atherosclerosis. *J Clin Virol* 16, 17-24 (2000).
22. Hsich E, Zhou YF, Paigen B, Johnson TM, Burnett MS, Epstein SE: Cytomegalovirus infection increases development of atherosclerosis in Apolipoprotein-E knockout mice. *Atherosclerosis* 156: 23-28 (2001).
23. Jault FM, Jault JM, Ruchti F, Fortunato EA, Chuck C, Corbeil J, Richman DD, Spector D: Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* 69: 6697-6704 (1995).

24. Jiang HY, Petrovas C, Sonenshein GE: RelB-p50 NF- κ B complexes are selectively induced by cytomegalovirus immediate-early protein 1: differential regulation of Bcl-x_L promoter activity by NF- κ B family members. *J Virol* 76: 5737-5747 (2002).
25. Johnson RA, Yurochko AD, Poma EE, Zhu L, Huang ES: Domain mapping of the human cytomegalovirus IE1-72 and cellular p107 protein-protein interaction and the possible functional consequences. *J Gen Virol* 80: 1293-1303 (1999).
26. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: Zytomegalievirus. In: *Medizinische Mikrobiologie*, 9. Aufl., Thieme-Verlag, S. 429-431 (1998).
27. Li F, Yin M, Van D, Joanne G, Grauls G, Rozing J, Bruggemann CA: Cytomegalovirus infection enhances the neointima formation in rat aortic allografts: effect of major histocompatibility complex class I and class II antigen differences. *Transplantation* 65: 1298-1304 (1998).
28. Libby P, Ridker PM, Maseri A: Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143 (2002).
29. Lu M, Shenk T: Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J Virol*. 70: 8850-8857 (1996).
30. Meerschaert J, Furie MB: The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18 and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1 and other ligands on endothelium. *J Immunol* 154: 4099-4112 (1995).
31. Michelson S: Interaction of human Cytomegalovirus with Monocytes/Macrophages: A love- hate relationship. *Path Biol* 45: 146-158 (1997).
32. Mueller C, Hodgson J, Bestehorn HP, Brutsche M, Perruchoud AP, Marsch S, Roskamm H, Buettner HJ: Previous cytomegalovirus infection and restenosis after aggressive angioplasty with provisional stenting. *J Interven Cardiol* 16:307-313 (2003).
33. Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Madsen TE, Bair TL, Pearson RR, Anderson JL: Cytomegalovirus seropositivity and C-reactive protein have independent and combined predictive value for mortality in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Circulation* 102: 1917-1923 (2000).
34. Muller WA, Randolph GJ: Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* 66: 698-704 (1999).

35. Murphy EA, Streblow DN, Nelson JA, Stinski MF: The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S phase of permissive cells. *J Virol* 74: 7108-7118 (2000).
36. Neumann FJ, Kastrati A, Miethke T, Mehilli J, Pogatsa-Murray G, Koch W, Seyfarth M, Schöming A: Previous cytomegalovirus infection and restenosis after coronary stent placement. *Circulation* 104: 1135-1139 (2001).
37. Pajovic S, Wong L, Black A, Clifford Azizkhan J: Identification of a viral kinase that phosphorylates specific E2Fs and pocket proteins. *Mol Cell Biol* 17: 6459-6464 (1997).
38. Reinhardt B, Minisini R, Mertens T: Opinion Article: Cytomegalovirus is a risk factor in atherogenesis. *Herpes* 9: 21-23 (2002).
39. Reinhardt B, Vaida B, Voisard R, Keller L, Breul J, Metzger H, Herter T, Baur R, Lüske A, Mertens T: Human cytomegalovirus infection in human renal arteries in vitro. *Journal of Virological Methodes* 109: 1-9 (2003).
40. Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126 (1999).
41. Schaarschmidt P, Reinhardt B, Michel D, Vaida B, Mayr K, Lüske A, Baur R, Gschwend J, Kleinschmidt K, Kountidis M, Wenderoth U, Voisard R, Mertens T: Altered expression of extracellular matrix in human-cytomegalovirus-infected cells and a human artery organ culture model to study its biological relevance. *Intervirology* 42: 357-364 (1999).
42. Smith MS, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD: Human cytomegalovirus induces monocyte differentiation and migration as a strategy for dissemination and persistence. *J Virol*. 78: 4444-4453 (2004).
43. Smith MS, Bentz GL, Smith PM, Bivins ER, Yurochko AD: HCMV activates PI(3)K in monocytes and promotes monocyte motility and transendothelial migration in a PI(3)K-dependent manner. *J Leukoc Biol*. 76: 65-76 (2004).
44. Sorlie PD, Nieto F, Javier MD, Adam E, Folsom AR, Shahar E, Massing M: A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1 and coronary heart disease: the Atherosclerosis risk in communities (ARIC) Study. *Arch Intern Med* 160: 2027-2032 (2000).
45. Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE: Potential role of human cytomegalovirus and p53 intraction in coronary restenosis. *Science* 265: 391-394 (1994).

46. Speir E, Yu ZX, Ferrans VJ, Huang ES, Epstein SE: Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 83: 210-126 (1998).
47. Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung vom 27. Januar 2004, Todesursachen 2002.
48. Streblov DN, Nelson JA: Models of HCMV latency and reactivation. *Trends in Microbiology* 11: 293-295 (2003).
49. Streblov DN, Orloff SL, Nelson JA: Do Pathogens accelerate atherosclerosis? *J Nutr* 131: 2798-2804 (2001).
50. Takahashi K, Takeya M, Sakashita N: Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* 35: 179-203 (2002).
51. Tanaka K, Zou JP, Takeda K, Ferrans VJ, Sandford GR, Johnson TM, Finkel T, Epstein SE: Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on p53-mediated apoptosis in coronary smooth muscle cells. *Circulation* 99: 1656-1659 (1999).
52. Tiran A, Tio RA, Ostenveld E, Harmsen MC, Tiran B, Heijer P, Monnick SHJ, Wilders-Truschnig MM, The TH: Prior cytomegalovirus infection does not predict clinical outcome after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Cardiology* 90: 263-268 (1998).
53. Voisard R, Baur R, Voglic S, Koenig W, Hombach V: The coronary transfilter co-culture unit: an in vitro model for cellular and molecular studies of human coronary restenosis. *Perfusion* 11: 521-525 (1998).
54. Voisard R, Göttling T, Reinhardt B, Vaida B, Baur R, Lüske A, Mertens T, Hombach V: Human cytomegalovirus triggers smooth muscle cell proliferation: Data of cellfree and cellbased infection in a human coronary transfilter co-culture model. Publikation in Vorbereitung.
55. Voisard R, Göttling T, Reinhardt B, Vaida B, Baur R, Lüske A, Mertens T, Hombach V: Zellfreie und Monozyten-basierte humane Zytomegalie-Virus-Infektion: gesteigerte Proliferation von glatten Muskelzellen in einem koronaren 3D-in-vitro-Modell. *Perfusion* 17: 88 (Abstract) (2004).
56. Voisard R, Krügers T, Reinhardt B, Vaida B, Baur R, Herter T, Lüske A, Weckermann D, Weingärtner K, Rössler W, Mertens T, Hombach V: HCMV-infection in a human arterial organ culture model: Effects on cell proliferation and neointimal thickening. Publikation in Vorbereitung.

57. Voisard R, Krügers T, Reinhardt B, Vaida B, Baur R, Herter T, Lüske A, Weckermann D, Weingärtner K, Rössler W, Mertens T, Hombach V: Keine Stimulation der reaktiven Zellproliferation und neointimalen Hyperplasie nach Infektion mit dem Zytomegalievirus in einem nicht ballonisiertem ex vivo Organkultur-Modell. In: Heinle H, Schulte H, Hahmann H (Hrsg), Prävention atherosklerotischer Prozesse. Köhler Druck, Tübingen, S. 123-127.
58. Voisard R, Voglic S, Baur R, Susa M, Koenig W, Hombach V: Leukocyte attack in a 3D human coronary in-vitro model. *Coron Artery Dis* 12: 401-411 (2001).
59. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Komori K, Hirai K, Sugimachi K, Sueishi K: The immediate early gene of human cytomegalovirus stimulates vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 447-451 (1997).
60. Yurochko AD, Huang ES: Human cytomegalovirus binding to human monocytes induces immunoregulatory gene expression. *J Immunol* 162: 4806-4816 (1999).
61. Zhang Z, Huong SM, Wang X, Huang DH, Huang ES: Interactions between human cytomegalovirus IE1-72 and cellular p107: functional domains and mechanisms of up-regulation of cyclin E/cdk2 kinase activity. *J Virol* 77: 12660-12670 (2003).
62. Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, Popma JJ, Yu ZX, Finkel T, Epstein SE: Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med* 335: 624-630 (1996).
63. 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 β -receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 608-613 (1999).

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich bei und während des Erstellens dieser Dissertation unterstützt haben:

Meinem Doktorvater PD Dr. med. Rainer Voisard, der mir dieses interessante Thema überlassen hat und mir beratend, aber auch motivierend hilfreich zur Seite stand.

Regine Baur danke ich im Besonderen für ihre zuverlässige und kompetente Unterstützung während der experimentellen Phase dieser Dissertation und dafür, dass sie mich ausgezeichnet in die Methodik der Zellkultur eingearbeitet und mich in wissenschaftliches Arbeiten eingeführt hat.

Ihr, dem gesamten Laborteam und den Mitarbeitern der angrenzenden Labore möchte ich für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Laborzeit danken.

Ebenso der Abteilung Virologie unter Prof. Dr. T. Mertens für ihre Unterstützung bei den Arbeiten mit dem Virus, darunter der immer verlässlichen und termingerechten Infektion der Monozyten.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich für ihre selbstverständliche ideelle und materielle Unterstützung in der Zeit des Studiums und während des Erstellens dieser Arbeit. Meiner Schwester Silke und Christian, meinem Freund und „Mitreiter“, danke ich für ihr offenes Ohr und ihre Hilfe bei den größeren und kleineren Problemen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgetreten sind.