Aus dem Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Jahn

In-vivo-Untersuchung der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 in HCMV-infiziertem Gewebe

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ariane Klein
aus
Reutlingen
2004

Dekan: Professor. Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Sinzger

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Müller

1 Einleitung *5*

1.1 Epidemiologie des humanen Cytomegalovirus **5**

1.2 Klinik der HCMV-Infektion **5**

1.3 Aufbau und Replikation von HCMV **7**

1.4 Pathogenese von HCMV-Infektionen **9**

1.5 HCMV-spezifische Immunreaktionen **11**

2 Fragestellung *15*

3 Material und Methodik *17*

3.1 Materialien **17**

3.1.1 Gewebe: 17

3.1.2 Antikörper: 18

3.1.3 Reagenzien: 19

3.1.4 Geräte: 20

3.2 Immunhistochemische Färbungen **20**

3.2.1 Gewebevorbehandlung 21

3.2.2 Immunfärbung 22

3.2.3 Gegenfärbung 24

3.3 Immunhistochemische Doppelfärbungen: **25**

4 Ergebnisse *26*

4.1 Verteilung HCMV-infizierter Zellen **27**

4.2 Expression von ICAM-1 in HCMV-infizierten Zellen direkt und in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen. **28**

4.2.1 ICAM-1 Expression in den einzelnen HCMV-infizierten Zellen. 28

4.2.2 ICAM-1 Expression in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen 29

4.3 Expression von VCAM-1 in HCMV-infizierten Zellen direkt und in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen. **30**

4.3.1 VCAM-1 Expression auf Einzelzellebene in HCMV-infizierten Zellen 31

4.3.2 VCAM-1 Expression in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen ___ 32

4.4 ELAM-1 Expression in einzelnen HCMV-infizierten Zellen und in der Umgebung HCMV-positiver Zellen ___ 32

4.5 Verteilung von Leukozyteninfiltraten ___ 33

5 Diskussion ___ 35

6 Zusammenfassung ___ 43

7 Bildanhang ___ 46

8 Literaturverzeichnis ___ 65

Danksagung ___ 74

Lebenslauf ___ 75

1 Einleitung

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) erhielt seinen Namen durch die mikroskopisch erkennbare Vergrößerung infizierter Zellen (Zytomegalie).

Es wird in die Familie der Herpesviridae eingereiht, mit denen es viele Gemeinsamkeiten aufweist, wie eine sehr ähnliche Morphologie, die Fähigkeit zu lebenslanger Latenz im menschlichen Körper mit Episoden endogener Reaktivierung und eine hohe Durchseuchungsrate. Als Hauptvertreter der Subfamilie der ß-Herpesvirinae wird es vor allem gekennzeichnet durch eine hohe Wirtsspezifität und einen langsamen Vermehrungszyklus mit Riesenzellbildung (Bienz, 1993).

1.1 Epidemiologie des humanen Cytomegalovirus

Die Durchseuchung mit dem humanen Cytomegalovirus variiert weltweit in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Standard eines Landes (Krech, 1973). Während in vielen Ländern Afrikas und Asiens die Prävalenz HCMV-spezifischer Antikörper im Erwachsenenalter mit bis zu 100% angegeben wird, liegt sie in den westlichen Industrieländern zwischen 40 und 70% (Lamberson & Dock, 1992). Die Übertragung kann diaplazentar, durch Muttermilch, durch Schmier- oder Tröpfcheninfektion, durch Bluttransfusionen oder Organtransplantationen und sexuell erfolgen. (Britt & Alford, 1996, Hamprecht et al., 2001). Das Virus ist in Speichel, Tränen, Blut, Muttermilch, Vaginalsekret und Sperma nachweisbar. (Jahn et al., 1988, Pass, 1985)

1.2 Klinik der HCMV-Infektion

Bei immunkompetenten Menschen verläuft die Primärinfektion mit dem humanen Cytomegalovirus meistens symptomlos. In einzelnen Fällen kann es zu einem mononukleoseähnlichen Krankheitsbild mit Lymphadenopathie und leichter Hepatitis kommen (Alford & Britt, 1993). Auch eine endogene Reaktivierung ist bei diesen Personen im allgemeinen inapparent und kann nur durch die Virusausscheidung in verschiedenen Organen erkannt werden.

Die konnatale Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus ist die häufigste angeborene Virusinfektion. Kommt es während der Schwangerschaft zu einer Primärinfektion der Schwangeren, infizieren sich etwa 30 % der Feten, wovon 10 % erkranken. War die Mutter schon vor der Schwangerschaft seropositiv, kommt es in etwa 10 % der Fälle zu einer Reaktivierung, die selten in einer Erkrankung des Neugeborenen resultiert. Eine Reinfektion seropositiver Mütter mit einem anderen HCMV-Stamm kann jedoch zu intrauteriner Transmission des Virus und symptomatischer Infektion des Neugeborenen führen (Boppana et al., 2001). Die Auswirkungen einer konnatalen Infektion können Frühgeburt, Hepatitis mit prolongiertem Ikterus, Hepatosplenomegalie, thrombozytopenische Purpura, interstitielle Pneumonie, Chorioretinitis und Mikrozephalie mit zentralnervöse Schädigungen sein (Boppana et al., 1992). Die Letalität der symptomatischen konnatalen CMV-Infektion beträgt etwa 30 % (Jones & Isaacs, 1995). Bei einem großen Anteil der Überlebenden tritt als Spätfolge vor allem Schwerhörigkeit auf (Dahle et al., 2000). Peri- und Postnatal ist das Erkrankungsrisiko geringer für das Kind. Postnatal spielt zunächst die Übertragung von HCMV durch die Brustmilch einer seroposotiven Mutter beim Stillen eine wichtige Rolle. Während reifgeborene Kinder fast nie Symptome entwickeln, kann eine postnatale HCMV-Infektion bei Frühbegorenen in Einzelfällen zu schweren Krankheitsbildern bis hin zur Sepis führen (Hamprecht et al., 2001). Jenseits des Säuglingsalters werden HCMV-Infektionen überwiegend durch direkten Kontakt mit infektiösem Speichel oder Urin übertragen und verlaufen bei immunkompetenten Menschen fast immer symptomlos.Bisweilen jedoch kann ein mononukleoseähnliches Krankheitsbild auftreten (Klemola et al., 1969, Zanghellini et al., 1999). Nach primärer HCMV-Infektion bei gesunden Erwachsenen wird das Virus über einige Monate im Urin ausgeschieden und nur über einen kurzen Zeitraum über Speichel und genitale Sekrete (Klemola et al., 1969, Zanghellini et al., 1999).

Bei immunsupprimierten Patienten ist die HCMV-Infektion eine gefürchtete Komplikation. Betroffen sind Menschen mit angeborenen und erworbenen Immundefekten (z.B. AIDS) sowie Patienten unter immunsuppressiver Therapie. Das Virus besitzt die Fähigkeit, im Organismus hämatogen durch infizierte Makrophagen und infizierte zirkulierende Endothelzellen zu disseminieren (Grefte et al., 1994, Sinzger & Jahn, 1996). Durch seinen breiten Zelltropismus kann nahezu jedes Organ

befallen werden (Sinzger et al., 1995). Diesem breiten Zell- und Organtropismus entspricht eine Vielzahl von Manifestationen, von Fieber und mononukleoseähnlichem Krankheitsbild bis hin zu Leukopenie, Retinitis (Augsburger & Henry, 1978), Enzephalitis, Ösophagitis, Gastritis, Kolitis (Foucar et al., 1981), Hepatitis (Paya et al., 1989) und interstitieller Pneumonie (Ramsey et al., 1980) mit einer Letalität von 50 %. Retinitis und gastrointestinale Ulzerationen sind die häufigsten Manifestationen der HCMV-Erkrankung bei AIDS-Patienten (Hamprecht & Jahn, 1994).

Eine besondere Bedeutung erhält das humane Cytomegalovirus in Zusammenhang mit Organtransplantationen. Das Spenderorgan stellt eine wichtige Infektionsquelle dar. Zudem begünstigt die immunsuppressive Therapie der Patienten einen Ausbruch der Erkrankung. Darüber hinaus scheint die HCMV-Infektion bei Transplantatempfängern die Abstoßung des Organs zu begünstigen. Studien zeigen, dass Transplantatabstoßungen bei HCMV-positiven Nierentransplantierten viel häufiger auftreten als bei HCMV-negativen Patienten. (Tong et al., 2002, von Willebrand et al., 1986) Darüber hinaus zeigen mehrere Studien bei HCMV-positiven Patienten eine Assoziation mit einer progressiven Gefäßsklerose, einer Hauptmanifestation chronischer Transplantatabstoßungen bei Herztransplantaten (Everett et al., 1992, Grattan et al., 1989, Loebe et al., 1990, McDonald et al., 1989, Valantine, 1999, Waldman, 1998). Allerdings gibt es auch Studien, die diesen Zusammenhang in Frage stellen (Gulizia et al., 1995, Nadasdy et al., 1994, Stovin et al., 1989). Unklar sind auch die Mechanismen, wie eine HCMV-Infektion Transplantatabstoßungen begünstigen könnte. Im allgemeinen haben Patienten mit einer primären HCMV-Infektion eine schlechtere Prognose als Patienten mit rekurrenter Infektion (Rubin, 1990).

1.3 Aufbau und Replikation von HCMV

Infektiöse Partikel des humanen Cytomegalovirus enthalten eine core-Region mit dem viralen Genom aus doppelsträngiger DNA, welche durch assoziierte Proteine dicht aufgerollt ist. Mit 235 kbp (Chee et al., 1990) trägt HCMV das größte Genom unter den humanpathogenen Herpesviren. Dieses besteht aus zwei einmalig vorkommenden Sequenzen von unterschiedlicher Länge, der unique long (U_L) und der unique short (U_S) Region (Mocarski & Courcelle, 2001). Diese beiden Regionen werden durch zweifach

vorhandene Sequenzen gleicher Struktur flankiert. Je nach Lage spricht man von den internal repeats (innerhalb des Genoms) und den terminal repeats (am Ende des Genoms). Die beiden unique-Regionen können jeweils auch umgekehrt angeordnet sein, was zu vier Isomeren führt, die etwa gleich häufig vorkommen (Mocarski, 1993).

Die core-Region ist in ein icosaedrisches Kapsid verpackt. Dieses Nukleokapsid ist von einer amorphen Masse aus Strukturproteinen umgeben, dem Tegument (Wright et al., 1964). Zu den Hauptbestandteilen des Teguments gehören unter anderem die Proteine pp150 und pp65, die sehr stark immunogen wirken (Jahn et al., 1987). Diese Komponenten werden von einer zellulären Lipid-Doppelmembran umhüllt, die eine große Anzahl viraler trägt Glykoproteine (Britt & Mach, 1996, Spaete et al., 1994).

Zusätzlich zu den Virionen werden von HCMV-infizierten Zellen noch zwei weitere Partikel produziert, die jedoch nicht infektiös sind. Sogenannte „Dense bodies“ haben kein Nukleokapsid und enthalten vor allem das Tegumentprotein pp65 (Klages et al., 1989). Sie werden etwa in gleicher Anzahl wie infektiöse Virionen hergestellt. Daneben treten in kleineren Mengen sogenannte „non infectious enveloped particels“ auf, die zwar ein Kapsid enthalten, denen jedoch die DNA fehlt (Irmiere & Gibson, 1983). Die einzelnen Stämme humaner Cytomegaloviren weisen eine große Ähnlichkeit untereinander auf. Antikörper, die gegen einen Stamm gezüchtet wurden, reagieren in aller Regel auch mit anderen Stämmen (Mocarski, 1993). Allerdings existieren auch stammspezifische neutralisierende Antikörper, die heterogene Stämme von HCMV nicht zu neutralisieren vermögen (Klein et al., 1999).

Am Anfang des Replikationszyklus von HCMV steht das Anheften des Virus an die Wirtszelle (Adsorption), durch anschließendes Verschmelzen der Virushülle mit der Zellmembran (Penetration) gelangt das Virion in die Zelle. Nach dem Eintritt (Entry) wird das Nukleokapsid direkt zum Zellkern transportiert, in den es die virale DNA einschleust (Uncoating). Hierauf folgt eine streng regulierte Kaskade der Genexpression. Bereits 20-30 Minuten nach Virusexposition kann in der Zelle die Expression der viralen „sehr frühen“ (immediate early) Gene nachgewiesen werden (Michelson et al., 1977). Die Genprodukte der „sehr frühen“ Gene sind Regulatoren sowohl der viralen Genexpression, als auch von Genexpression in der Wirtszelle (Spector, 1996, Stenberg, 1996). Die „frühen“ (early) Gene werden hauptsächlich für

die DNA-Replikation und den DNA-Stoffwechsel benötigt. Die „späten“ (late) Gene codieren für Strukturproteine. Die fertigen Strukturproteine werden vom Zytoplasma in den Kern transportiert, wo sie zusammengebaut und mit DNA beladen werden. Diese Nukleokapside akkumulieren im Zellkern und führen zu lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturen, dem sogenannten Eulenaugen-Phänomen. Die Kapside werden mit Tegument verkleidet und an der inneren Kernmembran umhüllt (Mocarski, 1993). Die Virionen werden in Vesikeln über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert und dort per Exozytose freigesetzt (Eggers et al., 1992). Erst 48-72 Stunden nach der Infektion können infektiöse Virusnachkommen nachgewiesen werden; das ist im Vergleich zu anderen Herpesviren langsam (Mocarski, 1993).

1.4 Pathogenese von HCMV-Infektionen

Die Neuinfektion mit HCMV erfolgt durch Kontakt mit infizierten Körperausscheidungen oder durch Übertragung infizierter Blutzellen von einem zumeist symptomlos infizierten Menschen (Pass, 2001). Bei der intrauterinen Infektion, die - obgleich selten - wegen ihrer schwerwiegenden Komplikationen gefürchtet ist, wird ein hämatogener Transmissionsmodus angenommen (Arvin, 1997). Zahlenmäßig bedeutsamer ist die Übertragung durch infizierte Brustmilch während der Stillzeit, die jedoch selten mit einer Symptomatik einhergeht (Pass, 1985). Für die ebenfalls meist asymptomatische horizontale Transmission im Kleinkindalter werden überwiegend Schmier- und Kontaktinfektionen durch infektiösen Speichel und Urin angenommen (Adler, 1988). Im Erwachsenenalter kommt hierzu möglicherweise noch ein sexueller Übertragungsweg durch kontaminierte Genitalsekrete (Pass, 2001). Neben diesen natürlich auftretenden Übertragungen kommen auch iatrogene Infektionen vor, insbesondere durch kontaminierte Blutkonserven (Bowden, 1995) und durch die Transplantation infizierter Organe (Pass, 2001). Durch Abtrennung der Leukozyten lässt sich die Infektiosität von Blutkonserven weitgehend reduzieren (Bowden et al., 1995, Gilbert et al., 1989). Auf welchen Zellen die Infektiosität transplantierter Organe beruht, ist nicht bekannt.

Ebenso ist ungeklärt, in welchen Zellen nach erfolgter Übertragung die Primärreplikation von HCMV stattfindet. Prinzipiell kommen hierfür neben den

Epithelzellen der infizierten Schleimhäute auch ortsständige Makrophagen in Frage. Beide Zelltypen wurden als Zielzellen einer permissiven HCMV-Infektion identifiziert (Sinzger et al., 1995, Sinzger et al., 1996). Makrophagen könnten zudem auch an der hämatogenen Verbreitung von HCMV beteiligt sein, die schließlich zu einer systemischen Ausbreitung des Virus mit multiplen Organmanifestationen führen kann (Sinzger & Jahn, 1996). Neben Makrophagen können auch permissiv infizierte Endothelzellen (Grefte et al., 1993) und abortiv infizierte Granulozyten (Grefte et al., 1994, Mazeron et al., 1993) zur hämatigenen Aussaat von HCMV beitragen. Produktiv infizierte Endothelzellen scheinen sich im Verlauf der Virusreplikation von der Gefäßwand zu lösen und als zytomegale Zellen im Blutstrom zu zirkulieren (Grefte et al., 1995). Granulozyten unterstützen selbst keine Virusvermehrung (Grefte et al., 1994), können aber offensichtlich infektiöses Virus passiv transportieren.

In infizierten Organen stehen HCMV mit Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Makrophagen eine Vielzahl von Zielzellen für die Ausbreitung im Gewebe zur Verfügung (Sinzger & Jahn, 1996). Aufgrund dieses breiten Zelltropismus kann nahezu jedes Organ von HCMV befallen werden (Bissinger et al., 2002). Auf welche Weise ein infiziertes Organ funktionell oder strukturell geschädigt wird war immer wieder Gegenstand von Diskussionen. Ergebnisse aus einem Tiermodell zur CMV-assoziierten interstitiellen Pneumonie allogen Knochenmark-transplantierter Mäuse hatten zu der Hypothese geführt, das Cytomegalovirus selbst stoße ein immunpathologisches Geschehen nur an, sei aber an der Entwicklung der Entzündungsreaktion in der Folge nicht mehr beteiligt (Grundy et al., 1987). In vivo-Befunde in betroffenen Organen beim Menschen haben jedoch eine teils massive Replikation und Herdbildung von HCMV in entzündlich veränderten Arealen gezeigt, insbesondere auch in der Lunge von Patienten mit HCMV-assoziierter Pneumonie (Sinzger et al., 1995). Aus Zellkulturmodellen ist bekannt, dass die Infektion mit HCMV meist lytisch verläuft (Halwachs Baumann et al., 1998, Kahl et al., 2000, Riegler et al., 2000, Sinzger et al., 1999). Daher ist eine direkt zellschädigende Wirkung von HCMV auch in infizierten Organen anzunehmen. Vor diesem Hintergrund darf die entzündliche Reaktion eher als Versuch zur Eliminierung des Virus interpretiert werden denn als ein immunpathologisches Geschehen. Neuere Befunde im Maus-System stützen diese Sicht, denn es wurde gezeigt, dass die infiltrierenden

Lymphozyten in der Lunge spezifisch gegen CMV gerichtet waren, nicht jedoch gegen körpereigene Antigene (Podlech et al., 2000).

Im Kontext der Kontroverse über die immunpathologischen oder direkt zytopathogenen Mechanismen einer HCMV-Infektion wurde insbesondere auch infizierten Endothelzellen eine zentrale Rolle zugewiesen. Berichte über die Induktion der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (Craigen & Grundy, 1996, Sedmak et al., 1994) und ELAM-1 (Span et al., 1991) in infizierten Zellkulturen führten zu der Hypothese, infizierte Endothelzellen könnten über eine Hochregulierung entsprechender Adhäsionsmoleküle inflammatorische Zellen ins umliegende Gewebe lenken und so zu einer Entzündungsreaktion beitragen. Im transplantierten Organ könne auf diese Weise eine Abstossungsreaktion durch Immunzellen des Spenders getriggert werden (Waldman, 1998). Gestützt wurde diese Hypothese durch den Nachweis einer verstärkten Expression von ICAM-1 in infiziertem Gewebe (Lautenschlager et al., 1996). Ob die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen direkt in infizierten Zellen auftrat oder vielmehr in den infiltrierenden inflammatorischen Zellen, wurde in dieser Analyse nicht differenziert.

1.5 HCMV-spezifische Immunreaktionen

Während der Primärinfektion mit HCMV werden IgM- und IgG- Antikörper gebildet, diese sind jedoch vermutlich nicht entscheidend an der Viruskontrolle beteiligt (Modrow & Falke, 1997). Viel mehr scheint die zelluläre Immunantwort dabei eine tragende Rolle zu spielen, vor allem zytotoxische T-Lymphozyten, aber auch Natürliche Killerzellen. Dies erklärt auch die Tatsache, dass bei Patienten mit Schwächen in diesem Zweig der Immunantwort das größte Risiko besteht, an einer HCMV-Infektion zu erkranken (Mocarski, 1993). Trotzdem scheinen neutralisierende Antikörper in der Lage zu sein, die virämische Ausbreitung zu kontrollieren und vor einer Neuinfektion zu schützen. Jedoch kann keines der beiden Systeme eine latente Infektion verhindern (Modrow & Falke, 1997). Ob dabei eine echte Latenz vorliegt oder eine lebenslange Replikation aufrechterhalten wird, die sich mit der gleichzeitigen Elimination infizierter Zellen die Waage hält, ist bisher ungeklärt (Mocarski, 1993).

Das humane Cytomegalovirus interferiert seinerseits mit dem Immunsystem. Am besten untersucht wurde dabei die immunevasive Komponente. So wird MHC I in HCMV-

infizierten Zellen deutlich runterreguliert (Ahn et al., 1996, Jones et al., 1996, Waldman et al., 1998, Wiertz et al., 1996a, Wiertz et al., 1996b). Ein virales MHC I Homolog scheint des weiteren die Funktion der natürlichen Killerzellen zu inhibieren (Farrell et al., 1997, Reyburn et al., 1997). Auch das Komplementsystem wird Veröffentlichungen zufolge durch das HCMV gehemmt (Spear et al., 1995, Spiller et al., 1997, Spiller et al., 1996). Es wird darüber hinaus berichtet, dass HCMV in der Lage ist, die Apoptose der Wirtszelle zu inhibieren (Zhu et al., 1995). Andere Mechanismen des humanen Cytomegalovirus, der Immunantwort seines Wirtes entgegen zu wirken, werden vielfältig diskutiert (Hengel et al., 1998). Andererseits deuten die Assoziation von HCMV mit Transplantatabstoßungen und Läsionen in HCMV-positiven Geweben, die nicht durch das Virus direkt verursacht wurden, auf mögliche immunstimulatorische Eigenschaften von HCMV hin.

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 sowie ELAM-1 werden bei Transplantatabstoßungen und anderen immunologischen Vorgängen vermehrt exprimiert (Elangbam et al., 1997, Stolpe & Saag, 1996). Eine wichtige Aufgabe von ELAM-1, ICAM-1 und VCAM-1 besteht in der Vermittlung von Zell-Zellkontakten zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Über eine lockere Bindung an ELAM-1 können Leukozyten über das Endothel rollen, um festere Bindungen an ICAM-1 oder VCAM-1 zu ermöglichen. Binden endothelständiges ICAM-1 oder VCAM-1 an ihre Liganden auf einem Leukozyten, kommt es zu einem festen Anheften mit nachfolgender Extravasation und Migration des Leukozyten ins Gewebe. So können cytotoxische Zellen, die gegen HCMV-infizierte Zellen gerichtet sind, genauso in das Gewebe gelangen wie solche, die allogenes Gewebe erkennen. Vermutlich führen diese Interaktionen im Falle von ICAM-1 auch zur Ausschüttung von ICAM-1 induzierenden sowie von chemotaktischen Substanzen (Stolpe & Saag, 1996). Auf diese Weise wird das Entstehen eines inflammatorischen Infiltrates weiter verstärkt. ICAM-1 wird auf vielen endothelialen und epithelialen Zelllinien, Makrophagen, Lymphozyten, dendritischen Zellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen und Fibroblasten exprimiert (Stolpe & Saag, 1996, Wang & Springer, 1998). ICAM-1 kann in Verbindung mit MHC (major histocompatibility complex) Klasse II CD4-positive Helferzellen aktivieren. Außerdem ist ICAM-1 in der Lage, sowohl auf CD8-positive zytotoxische T-Lymphozyten, als auch auf Killerzellen kostimulatorisch zu wirken (Stolpe & Saag,

1996). Eine endotheliale VCAM-1 Expression wird meist entzündungsbegleitend beobachtet. (Postigo et al., 1993). Auch auf nicht vaskulären Zellen ist VCAM-1 induzierbar. Dazu gehören dendritische Zellen, hepatische Kupfferzellen, epitheliale Zellen in der Niere, Knochenmarkstromazellen, synoviale Zellen, embryonale Myozyten (Postigo et al., 1993) und Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (Braun et al., 1999). Auch zählen einige Autoren extravillöse Trophoblasten und Trophoblasten-Riesenzellen dazu (Bowen & Hunt, 1999, Zygmunt et al., 1998). ELAM-1 wird fast ausschließlich auf Cytokin-aktivierten Endothelzellen exprimiert. *In vitro* wird nur eine transiente Expression über einen Zeitraum von ca. 2-8 Stunden beobachtet (Elangbam et al., 1997). Sowohl ICAM-1 als auch VCAM-1 können vor allem durch TNF-α (Tumor nekrosis factor- α), Interferon-γ und Interleukin-1 induziert werden (Elangbam et al., 1997, Lee & Benveniste, 1999, Postigo et al., 1993).

Über die Adhäsionsmoleküle ELAM-1, ICAM-1 und VCAM-1 wird also die Immunantwort zum Ort des Geschehens gelenkt. Zu der Frage eines möglichen Einflusses der HCMV-Infektion auf die Expression von Adhäsionsmolekülen gibt es bisher keine eindeutigen Ergebnisse. In Zellkultur fanden einige Autoren eine Hochregulierung von ICAM-1 in HCMV-infizierten Endothelzellen (Sedmak et al., 1994, Shahgasempour et al., 1997, Waldman et al., 1998), Fibroblasten (Craigen & Grundy, 1996, Grundy & Downes, 1993, Grundy et al., 1993, Ito et al., 1995) und anderen Zellen (Ibrahim et al., 1993, Larcher et al., 1997, Stuart et al., 1997, van Dorp et al., 1993). Teilweise betrug die ICAM-1 Expression in infizierten Endothelzellkulturen das zehnfache, verglichen mit nicht infizierten Kontrollkulturen. Die VCAM-1 und ELAM-1 Expression wurde durch eine HCMV-Infektion nicht verändert (Sedmak et al., 1994). In vivo sind die Ergebnisse wesentlich uneinheitlicher. In Gewebeschnitten zeigte sich eine Mehrexpression von ICAM-1 und VCAM-1 in HCMV-infizierten Lebertransplantatbiopsien verglichen mit nicht infizierten Biopsien (Einsele et al., 1994, Lautenschlager et al., 1996). Eine vermehrte ELAM-1 Expression in Zusammenhang mit einer HCMV-Infektion der Organe konnte nicht beobachtet werden (Lautenschlager et al., 1996). In myokardialen HCMV-infizierten Biopsien wurde eine VCAM-1 Mehrexpression gegenüber HCMV-negativen Biopsien beobachtet, während die ICAM-1 Expression in diesen Biopsien keine Veränderungen aufwies. Die ELAM-1 Expression war in diesen Untersuchungen ebenfalls vermehrt,

wenn auch meist dezent und fokal (Allen et al., 1996, Koskinen, 1993). Ungeklärt bei den bisherigen in vivo Untersuchungen ist, in welchen Zelltypen (Parenchym- , Endothel- oder Entzündungszellen) die veränderte ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 Expression beobachtet wurde. Da symptomatische HCMV-Infektionen meist bei immunschwachen Patienten vorkommen, ist auch nicht ausgeschlossen, dass andere Pathogene die Expression der Adhäsionsmoleküle ebenfalls beeinflusst haben könnten.

Erstaunlicherweise fehlen in vivo bisher Befunde auf Einzelzelleben. Es ist unklar, ob die geschilderten Phänomene in den HCMV-infizierten oder in nicht infizierten Zellen stattfinden. Dies Unterscheidung wäre aber Voraussetzung, um zu klären, ob direkte virale Effekte oder immunpathologische Phänomene vorliegen. Beispielsweise im Falle von akuten oder chronischen Transplantatabstoßungen hat diese Frage auch klinische Relevanz. Wie bereits beschrieben, scheint eine HCMV-Infektion akute Abstoßungen und die progressive Gefäßsklerose von Transplantaten zu begünstigen. Eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 werden sowohl bei akuten Transplantatabstoßungen (Herskowitz et al., 1994, Park et al., 2000, Tanio et al., 1994, Zhang et al., 2000), als auch bei der progressiven Gefäßsklerose von Transplantaten (Denton et al., 2000, Labarrere et al., 1997) beobachtet. Eine erhöhte ELAM-1 Expression wurde eher transient im Vorfeld von akuten Abstoßungen beobachtet. (Briscoe et al., 1995, Ferran et al., 1993) Die zugrunde liegenden Pathogenesevorstellungen könnte so auch die therapeutischen Strategien beeinflussen. Bei einem immunvermitteltem Geschehen wären neben antiviralen Substanzen auch der Einsatz von immunmodulierenden Agenzien sinnvoll, beispielsweise um Expression oder Funktionalität der Adhäsionsmoleküle zu beeinflussen.

2 Fragestellung

HCMV interagiert auf vielfache Weise mit dem Immunsystem seines Wirtes. Es ist unklar, wie weit neben bekannten immunevasorischen Mechanismen auch immunstimulatorische Eigenschaften eine Rolle spielen. In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob die HCMV-Infektion in vivo mit einer verstärkten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 oder ELAM-1 assoziiert ist.

Die physiologische Aufgabe von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 besteht darin, Immunzellen ins Gewebe zu lenken. Eine Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 oder ELAM-1 würde eine Verstärkung der Immunantwort in HCMV-infiziertem Gewebe bedeuten. Dies wäre für das Virus von Nachteil, da es die Elimination von HCMV durch das Immunsystem fördern würde. Für den Wirtsorganismus hätte die vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle unter Umständen eine Steigerung von Gewebeschäden zur Folge. Ein wichtiger Aspekt ist, dass in HCMV-infizierten Transplantaten auch vermehrt Immunzellen, die gegen das körperfremde Gewebe gerichtet sind, in das Organ gelangen und dadurch Abstoßungsreaktionen begünstigt würden.

Eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen durch HCMV direkt müsste auch therapeutische Überlegungen beeinflussen. Zum Beispiel könnten neben einer konsequenten antiviralen Therapie auch Immunsuppressiva und Agenzien gegen die vermehrt exprimierten Adhäsionsmoleküle zum Einsatz kommen. In Zellkultursystemen wurde eine Hochregulierung von ICAM-1 in HCMV-positiven Zellen beobachtet. In vivo gibt es bislang keine Ergebnisse auf Einzelzellebene, somit auch keine Untersuchungen zu direkten Einflüssen von HCMV auf die Expression der Adhäsionsmoleküle.

Das Besondere dieser Arbeit ist, dass erstens die Untersuchungen in vivo durchgeführt wurden. Dafür wurden Biopsate verschiedener Organe und Plazentagewebe verwendet. Zweitens liegt hier erstmalig eine Analyse auf Einzelzellebene, also direkt in den HCMV-infizierten Zellen, vor. Hierzu wurden mit Hilfe immunhistochemischer Methoden entweder zwei Antigene (das immediate-early-Antigen von HCMV und eines der untersuchten Adhäsionsmoleküle) im gleichen Präparat dargestellt oder einzelne

Antigene in direkt aneinandergrenzenden Serienschnitten kenntlich gemacht. Die Verwendung von Plazentagewebe bot mehrere Vorteile. Einerseits konnte die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 auch in der Umgebung von HCMV-infizierten Zellen beurteilt werden, da die Zotten der Plazenta kleine voneinander abgetrennte Einheiten darstellen. Andererseits konnten so andere infektiöse Einflüsse weitgehend ausgeschlossen werden, da HCVM das einzige Pathogen in diesem Organ war.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Analyse der Expression von ICAM-1 in infiziertem Gewebe, da verschiedene Untersucher in Zellkultur eine Hochregulierung durch HCMV beschrieben hatten. Zudem war auch in Gewebeproben HCMV-infizierter Patienten eine Mehrexpression von ICAM-1 berichtet worden, ohne diese jedoch auf einzelne infizierte Zellen zu beziehen. Eine vergleichbare Hochregulierung von ELAM-1 und VCAM-1 wurde von der Mehrzahl der Untersucher in Zellkultur nicht gefunden. Da jedoch in Gewebeproben HCMV-infizierter Patienten die Expression dieser Adhäsionsmoleküle vereinzelt berichtet worden war, wurden auch sie in die Analyse mit einbezogen.

Insgesamt sollten diese in-vivo-Untersuchungen der Expression von Adhäsionsmolekülen in HCMV-infiziertem Gewebe einen Beitrag leisten, die Pathogenese von HCMV-Organinfektionen besser zu verstehen, und so theoretische Konzepte zur Behandlung einer HCMV-Infektion zu überprüfen und gegebenenfalls zu ergänzen.

3 Material und Methodik

3.1 Materialien

3.1.1 Gewebe:

Es wurden Gewebeschnitte von verschiedenen Patienten und aus unterschiedlichen Organen verwendet, aus Organen des Magen-Darmtraktes, aus der Lunge und aus der Plazenta. Die Patienten hatten verschiedene Grunderkrankungen. Die Gewebe lagen als Serienschnitte vor. Alle Schnitte waren formalinfixiert und in Paraffin eingebettet.

Organ	Entnahmeart	Grunderkrankung
Ösophagus, Antrum, Duodenum	Biopsate	HIV-positiver Patient
Duodenum und Antrum	Biopsate	HIV-positiver Patient
Wangenschleimhaut	Biopsate	Zustand nach Karzinom im Mund
Ileum und Kolon	Biopsate	Unbekannt; Patient mit Ileocolitis
Sigma	Resektat	Patient mit floridem Morbus Crohn
Rektum	Biopsate	Unbekannt; Patientin mit Kolitis
Magen und Ösophagus	Biopsate	Unbekannt; Patienten mit Ösophagitis
Kardia	Biopsate	Patient mit Kardiakarzinom in der Vorgeschichte
Kolon	Biopsate	Patientin nach Lebertransplantation
Lunge und Ösophagus	Biopsate	Zwei HIV-positive Patienten

Lunge	Biopsate	HIV-positiver Patient
Plazenta	Gewebeschnitte	Zwei Patientinnen mit HCMV-Villitis

3.1.2 Antikörper:

Die Primärantikörper waren monoklonal. Der Antikörper gegen HCMV markierte das immediate-early-Antigen, das wenige Stunden nach Infektion einer Zelle mit HCMV darstellbar wird. So wurden nahezu alle HCMV-infizierten Zellen erfasst. Bei der Markierung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 wurden unterschiedliche Antikörperklone verwendet und die Färbeergebnisse miteinander verglichen. Alle Antikörper waren paraffingängig.

Spezifität	Spezies	Firma
Monoklonaler Anti-Human CMV I.E.A. (immediate-early-Antigen); clone E 13	Maus	Argene Biosoft, Varilhes, Frankreich
Monoklonaler Anti-Human CD54 (ICAM-1); clone W-CAM-1	Maus	Chemikon International Inc., Temecula, CA, USA
Monoklonaler Anti-Human CD54 (ICAM-1); clone 23G12	Maus	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK
Monoklonaler Anti-Human CD106 (VCAM-1); clone 1.4C3	Maus	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Monoklonaler Anti-Human CD106 (VCAM-1); clone 1.4C3	Maus	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK
Monoklonaler Anti-Human CD62E (E-selectin); clone 16G4	Maus	Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK

Monoklonaler Anti-Human von Willebrand-Faktor (Faktor VIII)	Kaninchen	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Anti-Mouse, biotinyliert (Sekundärantikörper)	Kaninchen	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Nonimmunserum	Kaninchen	DAKO, Carpinteria, CA, USA

3.1.3 Reagenzien:

Xylol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
PBS: 137 mol/l NaCl; 2,7 mol/l KCl; 7,3 mol/l Na_2HPO_4; 1,5 mol/l KH_2PO_4	
Tris-Puffer 0,05 mol/l, pH 7,6	
Wasserstoffperoxid 30 % H2O2	Merck KGaA, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Protease Typ 24	Sigma, St. Louis, USA
Target Retrieval Solution	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Strept AB Complex/AP (1 ml Streptavidin, 1 ml biotinylierte Alkalische Phosphatase)	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Strept AB Complex/HRP (1 ml Streptavidin, 1 ml biotinylierte Meerrettich Peroxidase)	DAKO, Carpinteria, CA, USA
Sigma Fast™; 3,3'-Diaminobenzidine Tablet (DAB-Peroxidase Substrat) + Urea Hydrogen Peroxide Tablet	Sigma, St. Louis, USA

Peroxidase Substrat) + Urea Hydrogen Peroxide Tablet	
Sigma Fast™ Fast Red; Fast Red TR/ Naphtol ASMX Tablet + Tris buffer Tablet	Sigma, St. Louis, USA

3.1.4 Geräte:

Feuchte Kammer; Sigma humid chamber (H6644)	Sigma, St. Louis, USA
Schüttelgläser	Glaswerk, Wertheim
Inkubator; Stericult 200	Labotect, Göttingen
Vortex– Genie 2	Scientific industries, Bohemia, NY, USA
pH-Meter; 761 Calimatic	Knick, Berlin
Magnetrührer	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Polyvar Light Microscope	Cambridge Instruments, Nussloch

3.2 Immunhistochemische Färbungen

Die im folgenden beschriebene immunhistochemische Färbung wurde zur Darstellung einzelner Antigene durchgeführt. Sie fand Anwendung bei Positiv- und Negativkontrollen und bei Färbung verschiedener Antigene in aufeinanderfolgenden Präparaten in Serienschnitten.

3.2.1 Gewebevorbehandlung

Entparaffinieren:

Die Objektträger mit den in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst 30 Minuten lang bei 50° C erwärmt, dann sofort zwei mal je 15 Minuten in Xylol behandelt. Anschließend wurden die Präparate in 100 %igem Ethanol zwei mal je 1 Minute dehydriert.

Blockieren der endogenen Peroxidase:

Die Färbereaktion mit Peroxidase kann auch durch gewebeständigen Peroxidase katalysiert werden, was zu einem unspezifischen Färbeergebnis führen würde. Um dies zu verhindern wurde die endogene Peroxidase irreversibel mit Wasserstoffperoxid blockiert. Dafür wurden die Präparate 20 Minuten in einer Lösung von Methanol und 30 %igem Wasserstoffperoxid im Verhältnis 50:1 belassen. Dieser Schritt entfiel bei Färbung mit Alkalischer Phosphatase.

Rehydrieren:

In einer absteigenden Alkoholreihe (je 1,5 Minuten in 90 %igem, 70 %igem und 50%igem Ethanol, dann 1,5 Minuten im destillierten Wasser) wurden die Gewebeschnitte schrittweise rehydriert. Anschließend wurde das Wasser gegen PBS-Puffer ausgetauscht.

Antigendemaskierung:

Im folgenden werden verschiedene Methoden der Antigendemaskierung beschrieben, die alternativ, abhängig vom jeweiligen Primärantikörper, angewandt wurden.

Protease:

> Für die Darstellung der CMV– Antigene immediate early und early, des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (Antikörper von Chemikon) und des Zellmarkers Faktor VIII konnten durch die Gewebeandauung mit Protease 24 gute Färbeergebnisse erzielt werden. Hierfür wurde die 0,1%ige Proteaselösung direkt auf die Gewebeschnitte pipettiert und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen.

Target Retrieval Solution von DAKO:

Bei der immunhistochemischen Darstellung von VCAM-1 (Antikörper von DAKO) wurde dieses Detergenz benutzt, um Epitope des Antigens freizusetzen. Die Präparate wurden hierfür in der Target retrieval Lösung pH 6,1 in einem Wasserbad von 95-99 °C 30 Minuten lang inkubiert. Daran schloss sich eine Abkühlungszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur und danach wurde 5 Minuten im PBS-Puffer gewaschen.

EDTA:

Zur besseren Darstellung der Antikörper gegen ICAM-1 und VCAM-1 von Novo Castra wurden 1,6 l einer 1 mM EDTA-Lösung mit pH 8 hergestellt und diese in einem Schnellkochtopf zum Kochen gebracht. Nun wurden die Präparate hineingegeben und 4 Minuten bei geschlossenem Deckel in der kochenden Lösung belassen. Es schloss sich 5-minütiges Waschen in PBS-Puffer an.

3.2.2 Immunfärbung

Absättigen unspezifischer Bindungsstellen mit Nonimmunserum:

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden wurde mit einem Nonimmunserum vom Kaninchen blockiert. Dazu wurde eine 1:10 mit PBS verdünnte Lösung des Nonimmunserums auf die Gewebeschnitte pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Serum abgekippt und die Reste entfernt und sofort der nächste Schritt angeschlossen.

Primärantikörper:

Ein monoklonaler Antikörper der Maus sollte nun an das darzustellende Antigen binden. Der jeweilige Antikörper wurde in PBS-Puffer verdünnt.

Verdünnung der einzelnen Antikörper:

E13	1:1000 oder 1:4000, je nach Fixierung

Faktor VIII	1:50
ICAM-1 (chemikon)	1:250 oder 1:1000, je nach Gewebeart und Fixierung
ICAM-1 (Novo Castra)	1:25
VCAM-1 (DAKO)	1:50
VCAM-1 (Novo Castra)	1:50
E-Selectin	1:50 oder 1:25, je nach Gewebe

Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37 °C, anschließend wurde für 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen.

Sekundärantikörper:

An den Primär-Antikörper wurde ein Kaninchenantikörper gegen Mäuseantikörper gebunden, welcher mit 2 Molekülen Biotin gekoppelt war. Dieser wurde in einer Lösung von Nonimmunserum und PBS (siehe 3.2.5) verdünnt. Abhängig vom Präparat betrug die Verdünnung 1:400 oder 1:800. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurde 50 Minuten in PBS-Puffer gewaschen, wenn eine Peroxidase-Färbung folgte oder. in Tris-Puffer, wenn eine Färbung mit Alkalischer Phosphatase durchgeführt werden sollte.

Streptavidin-Biotin-Komplex:

Über die Biotinmoleküle am Sekundärantikörper wurden nun Streptavidin-Biotin-Komplexe gebunden, welcher mit dem Enzym Peroxidase, bzw. Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Der Komplex wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 Minuten in PBS- oder Tris-Puffer gewaschen.

Färbung:

Bei diesem Schritt wurde dem jeweiligen Enzym ein Substrat beigegeben, bei dessen Umsetzung durch das Enzym ein farbiger Niederschlag an der Stelle entstand, an der

das Enzym über Biotin, Sekundär- und Primärantikörper an das gesuchte Antigen gebunden war.

Peroxidase:

> Diese Färbung fand Anwendung bei der Darstellung der CMV-Antigene. Als Substrat der Peroxidase wurde Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) verwendet. Die DAB-Tabletten wurden in 1 ml destillierten Wasser aufgelöst. Diese Lösung wurde auf die Gewebeschnitte pipettiert und das Färbeergebnis, welches sich in einem braunen Niederschlag zeigte, unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei befriedigender Signalintensität oder nach 15 Minuten Inkubation wurde die Färbung durch Spülen mit PBS-Puffer abgebrochen.

Alkalische Phosphatase.

> Mit dieser Methode wurden die Antigene ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, der Endothelmarker Faktor VIII und LCA angefärbt. Mit Fast Red Färbetabletten und 1 ml destilliertem Wasser wurde eine Lösung hergestellt und diese wurde dann auf die Präparate pipettiert. Im Mikroskop konnte die Intensität der Rot-Färbung überwacht werden. Die Färbung wurde nach mikroskopischer Kontrolle durch Spülen mit Tris-Puffer abgebrochen.

Eine spezifische Darstellung des HCMV-Antigens zeigte sich in einer ausschließlich nukleär lokalisierten Färbung. Eulenaugenzellen unter den Signal-positiven Zellen bestätigten, dass auch Zellen in einem späten Stadium der HCMV-Infektion dargestellt wurden. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 zeigten bei der Markierung ein zytoplasmatisches Signal. Eine spezifische Färbung äußerte sich in der vornehmlichen Darstellung von Gefäßendothelien und in einem heterogenen Signal. Das heißt, dass Signal-positive Zellen mit unterschiedlicher Intensität gefärbt waren, wobei von den verschiedenen Zelltypen niemals alle Zellen positiv waren.

3.2.3 Gegenfärbung

Zunächst wurden die Präparate für 5-10 Minuten im fließenden Leitungswasser gewaschen, anschließend 1 Minute in destilliertem Wasser und danach wurden die Objektträger für ca. 20 Sekunden in Hämalaun gegengefärbt. Dieses färbt Chromatin

blau. Dann wurden die Präparate wieder 5-10 Minuten in Leitungswasser und 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Zum Schluss folgte das Eindeckeln der Präparate mit Glycerolgelatine.

3.3 Immunhistochemische Doppelfärbungen:

Zur gleichzeitigen Darstellung zweier Antigene im gleichen Präparat wurde an eine immunhistochemische Färbung des ersten Antigens mit DAB eine zweite Färbung mit Alkalischer Phosphatase angeschlossen. Nach Schritt 3.2.9. (vor der Gegenfärbung) wurde nochmals Nonimmunserum aufpipettiert (Schritt 3.2.5.) und weiterhin die gleichen Arbeitsschritte (3.2.6. -3.2.10.) im Tris-Puffer ausgeführt. Statt Peroxidase war nun Alkalische Phosphatase an den Streptavidin-Biotin-Komplex gekoppelt, zur Färbung wurden Fast Red Tabletten von Sigma verwendet. Der erste Primärantikörper war gegen HCMV-Antigene gerichtet, so dass durch die DAB-Färbung HCMV infizierte Zellen einen braunen Zellkern aufwiesen. Der zweite Primärantikörper markierte entweder die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 oder VCAM-1 oder den Endothelmarker Faktor VIII. Durch die Fast Red Färbung erschienen dann entweder Endothelzellen oder die Expression des jeweiligen Adhäsionsmoleküls wurde durch ein rotes Zytoplasmasignal. Dadurch war es möglich in einem Präparat infizierte Endothelzellen zu identifizieren, bzw. auf Einzelzellebene den Zusammenhang zwischen HCMV-Infektion und Expression des jeweiligen Adhäsionsmoleküls zu betrachten.

Die umgekehrte Färbung, das heißt zuerst Färbung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 bzw. VCAM-1 mit DAB und anschließender Darstellung des HCMV-Antigens mit Fast Red, wurde als Kontrolle durchgeführt. Sie sollte sicherstellen, dass Signale des zweiten Primärantikörpers nicht durch eine unvollständige Bindung des ersten Sekundärantikörpers oder des Streptavidin-Biotin-Peroxidase Komplexes zustande gekommen waren.

4 Ergebnisse

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war zu untersuchen, ob HCMV *in vivo* direkt die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 oder ELAM-1 in seiner Wirtszelle beeinflussen kann. Alternativ wäre denkbar, dass die Expression dieser beiden Adhäsionsmoleküle in der unmittelbaren Umgebung HCMV-infizierter Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Arealen verändert ist. Dies könnte im Rahmen immunologischer Vorgänge in HCMV-infiziertem Gewebe auftreten. In situ Analysen zeigen zwar eine ICAM-1 Mehrexpression in HCMV-infizierten Zellen, *in vivo* gibt es zu dieser Frage jedoch keine Untersuchungen auf Einzelzelleben. Es ist entscheidend, dies zu differenzieren, um zu klären, ob Veränderung der ICM-1, VCAM-1 oder ELAM-1 Expression direkte virale Effekte zugrunde liegen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden in Biopsaten humaner Organe, also *in vivo*, durchgeführt. Im Vergleich zu Kultursystemen bietet dieses Vorgehen die Chance, die klinische Relevanz immunologischer Vorgänge widerzuspiegeln. Es wurden in einer retrospektiven Analyse Gewebeschnitte von Patienten mit akuter HCMV-Infektion untersucht. Alle Gewebeschnitte waren formalinfixiert und in Paraffin eingebettet. Das humane Cytomegalovirus kann sich in einer Vielzahl von Organen und Zelltypen vermehren. Um diesem Umstand gerecht zu werden, wurden Schnitte aus Lunge, Ösophagus, Magen, Duodenum, Ileum, Kolon, Rektum und Plazenta von unterschiedlichen Patienten in dieser Arbeit verwendet. Mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren wurden die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 dargestellt. HCMV-infizierte Zellen wurden durch Färbung des immediate-early-Antigen von HCMV kenntlich gemacht. Da dieses Antigen schon sehr bald nach Infektion einer Zelle exprimiert wird, werden dadurch nahezu alle HCMV-infizierten Zellen detektiert. Zur Klärung räumlicher Zusammenhänge wurde die Markierung der Antigene wurde in aneinandergrenzenden Serienschnitten durchgeführt. Darüber hinaus wurden simultan im selben Präparat HCMV-infizierte Zellen neben einem der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 oder VCAM-1 mit unterschiedlichen Farben dargestellt. Über beide Methoden konnte die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 in HCMV-infizierten Zellen direkt beurteilt und mit nicht infizierten Nachbarzellen verglichen werden. Diese Untersuchungen auf Einzelzellebene erlaubten Aussagen darüber, ob beobachtete

Phänomene direkte virale Effekte sind. Des weiteren konnte so auch die ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 Expression in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Gewebearealen untersucht werden. Insbesondere wurden hierfür Schnitte der Plazenta herangezogen. Dort stellen die Zotten der Plazenta kleine, gut voneinander abgegrenzte Funktionseinheiten dar. Die Plazenta war zudem in besonderer Weise geeignet. Erstens ist HCMV hier das einzige Pathogen. Zweitens wird die HCMV-Plazentitis nicht antiviral behandelt. In diesem Organ sind also Einflüsse durch Therapie und andere Krankheitserreger gering. Zur Darstellung von Leukozyteninfiltraten wurden weitere angrenzende Serienschnitte mit dem Leukozytenantigen LCA gefärbt. Dies sollte Hinweise auf die Funktionalität der Adhäsionsmoleküle geben.

4.1 Verteilung HCMV-infizierter Zellen

Zur Darstellung infizierter Zellen wurden Antikörper gegen die sehr frühen (immediate early) Antigene verwendet. Diese Antigene werden innerhalb weniger Stunden nach der Infektion einer Zelle durch das humane Cytomegalovirus detektierbar, früher als neu synthetisierte Virus DNA bei der in-situ-Hybridisierung. Sie sind im Zellkern lokalisiert und vorwiegend als Transaktivatoren der frühen (early) Gene wichtig. Die Markierung sehr früher Antigene ist geeignet um nahezu alle infizierten Zellen zu erfassen, da diese in allen Phasen des viralen Replikationszyklus nachweisbar sind.

In allen HCMV-positiven Gewebeschnitten zeigte sich nach Färbung der sehr frühen Antigene eine typische Zellkernfärbung. Unter den markierten Zellen fanden sich sowohl morphologisch unauffällige Zellen als auch Riesenzellen und Eulenaugenzellen, welche Zellen in einem späten Stadium der Infektion darstellen. Es waren zwischen 1 und 2000 Zellen pro Präparat infiziert. Die infizierten Zellen lagen entweder einzeln im Gewebe verstreut oder waren zu Herden gruppiert. Die Verteilung war heterogen. Morphologisch konnten sie als Darm- (Abb. 9 A,B) und Alveolarepithelzellen (Abb.11), Endothelzellen (Abb. 10, 12B), glatte Muskelzellen oder Trophoblasten identifiziert werden. Des weiteren waren darunter Stromazellen (Abb. 1-8, 12A, 14), bei denen es sich um Makrophagen, Fibroblasten oder andere mesenchymale Zellen handeln konnte (Sinzger et al., 1995, Sinzger & Jahn, 1996, Sinzger et al., 1996).

Eine immunhistochemische Doppelfärbung mit Antikörpern gegen das sehr frühe HCMV-Antigen (immediate-early-Antigen) und gegen den Endothelmarker Faktor VIII, sollte speziell die HCMV-Infektion von Endothelzellen verifizieren. Endothelzellen als Grenzschicht zwischen Blutkreislauf und Gewebe sind besonders interessant im Hinblick auf ihre ICAM-1 und VCAM-1 Expression, da an diesen Zellen die Leukozyten aus dem Blutkreislauf ins Gewebe rekrutiert werden. Der Antikörper gegen Faktor VIII färbte spezifisch die Gefäßränder, keine nicht-endothelialen Zellen wurden markiert. In den untersuchten Präparaten waren von den infizierten Zellen zwischen 2 und 12 % Endothelzellen.

4.2 Expression von ICAM-1 in HCMV-infizierten Zellen direkt und in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen.

Es sollte geklärt werden, ob in HCMV-infizierten Zellen und Geweben eine Mehrexpression von ICAM-1 stattfindet und ob dies aufgrund direkter viraler Effekt geschieht. Dazu wurde Expression von ICAM-1 in HCMV-infizierten Geweben und in den infizierten Zellen direkt untersucht. Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (CD54) wurde mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper sichtbar gemacht. Sowohl in HCMV-negativen Kontrollen (Abb.13), als auch in allen untersuchten HCMV-positiven Gewebeschnitten stellte sich ein charakteristisches Bild dar. Die Farbsignale waren immer heterogen im gesamten Gewebe verteilt. Es gab weder Stellen ganz ohne Signal, noch Areale, in denen jede einzelne Zelle gefärbt erschien. Allerdings stachen des öfteren Regionen durch eine stärkere Anfärbung hervor. Die Signalintensität war von Zelle zu Zelle verschieden. Nach morphologischer Beurteilung waren folgende Zelltypen vorwiegend angefärbt: Endothelzellen, Alveolarepithelzellen, Trophoblasten, Bindegewebszellen. Dabei waren aber nie alle Zellen eines Zelltyps gefärbt, auch war die Signalintensität sehr variabel. Durchgängig negativ stellten sich Zellen des Fettgewebes und Darmepithelzellen dar. Diese Charakteristika sprechen zusammen für eine spezifische Anfärbung von ICAM-1.

4.2.1 ICAM-1 Expression in den einzelnen HCMV-infizierten Zellen.

Zunächst sollte geklärt werden, ob HCMV einen direkten Effekt auf die ICAM-1 Expression in infizierten Zellen hat. Dazu wurde die ICAM-1 Expression auf Einzelzellebene in HCMV-infizierten Zellen analysiert. Hierzu wurden durch

Doppelfärbungen im gleichen Schnitt simultan die sehr frühen Antigene von HCMV und ICAM-1 dargestellt (Abb. 1-3,5,9-12). Auf diese Weise ließ sich auf Einzelzellebene die ICAM-1 Expression infizierter Zellen beurteilen. Bei Doppelfärbungen besteht die Gefahr ungenügender Sättigung von Primär- oder Sekundärantikörper während der ersten Färbung. Werden solche freien Bindungsstellen im Verlauf der zweiten Färbung der Doppelfärbung abgesättigt, kommt es zu falsch positiven Signalen. Zur Kontrolle solcher Artefakte wurden Einfachfärbungen in nebeneinander liegenden Serienschnitten mit Markierung von HCMV und ICAM-1 angefertigt (Abb. 6-8). Außerdem wurden bei Doppelfärbungen sowohl HCMV zuerst gefärbt und anschließend ICAM-1, als auch in umgekehrter Reihenfolge (Abb.4). Zur Auswertung wurden HCMV-infizierte Zellen aufgesucht. Die ICAM-1 Expression HCMV-infizierter Zellen wurde dann im Vergleich zu umliegenden nicht infizierten Zellen beurteilt. Auf Einzelzellebene stellten sich die Ergebnisse wie folgt dar: Die ICAM-1 Expression HCMV-infizierter Zellen unterschied sich kaum von der ICAM-1 Expression umliegender nicht infizierter Zellen (Abb. 1-12). Mit minimalen Schwankungen zwischen einzelnen Präparaten betrug der Prozentsatz der HCMV-infizierten Zellen mit erkennbar erhöhter ICAM-1 Expression weniger als 1,5 %, gemessen an allen HCMV-infizierten Zellen. Dabei ließen sich in jedem Präparat nicht infizierte Zellen finden, die eine ähnlich starke oder sogar stärkere ICAM-1 Expression aufwiesen. Unter den HCMV-infizierten Zellen mit erhöhter ICAM-1 Expression waren Endothelzellen, Stromazellen (Abb.1A, 2A) Trophoblasten und Alveolarzellen, kein Zelltyp hatte einen besonders hohen Anteil daran. *In vivo* fand sich keine relevante, fassbare Mehrexpression oder Hochregulierung von ICAM-1 in HCMV infizierten Zellen.

4.2.2 ICAM-1 Expression in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen

Es sollte geklärt werden, ob ein lokaler Zusammenhang zwischen der HCMV-Infektion eines Gewebes und der ICAM-1-Expression in der Umgebung infizierter Zellen besteht. Hierfür wurde insbesondere die Plazenta herangezogen. Die Zotten der Plazenta stellen einzelne, gut voneinander abgegrenzte Funktionseinheiten dar. Zotten mit HCMV-infizierten Zellen wurden aufgesucht; sie werden im Folgenden als HCMV-positive Zotten bezeichnet. Die ICAM-1-Expression dieser HCMV-positiven Zotten wurde im

Vergleich zu nicht HCMV-infizierten Nachbarzotten beurteilt (Abb. 1-8). Lokale Änderungen der ICAM-1 Expression in HCMV-negative Nachbarzellen von HCMV-infizierten Zellen konnten auf diese Weise erfasst werden.

Anders als auf Einzelzellebene stellte sich die Situation auf Zottenebene dar. In der Plazenta konnte ein lokaler Zusammenhang zwischen der Infektion einer Zotte und einer verstärkten ICAM-1 Expression erkannt werden. In ungefähr 50% der infizierten Zotten wurde im Vergleich zu nicht infizierten Nachbarzotten eine ICAM-1 Mehrexpression beobachtet, die sich meist nicht auf die infizierten Zellen direkt bezog, aber oft in deren näherer Umgebung zu finden war (Abb.1,2,3A,4,5,7). In vielen Fällen wies das Endothel dieser Zotten eine deutlich stärkere ICAM-1 Expression auf als das Endothel nicht infizierter Nachbarzotten (Abb. 4,6,8), daneben zeigten meist auch Trophoblasten (Abb. 4,6) und Stromazellen (Abb. 1,2,3A,4,5,7) ein intensiveres ICAM-1 Signal. In den Gefäßen mit starker ICAM-1 Expression, sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Zotten, fanden sich häufig adhärierende Leukozyten (Abb. 6,8). Dies wurde in ICAM-1 positiven Gefäßen beobachtet, die im angrenzenden Serienschnitt VCAM-1 positiv gefärbt waren, aber auch in VCAM-1 negativen. Somit scheinen die angefärbten ICAM-1 Moleküle eine für die Anheftung und Extravasion der Leukozyten ausreichende Funktion zu besitzen.

4.3 Expression von VCAM-1 in HCMV-infizierten Zellen direkt und in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen.

Die VCAM-1 Expression sollte in HCMV-infizierten Zellen direkt und deren Umgebung analysiert werden. Es wurde untersucht, ob eine etwaige Änderung der Expression von VCAM-1 auf einem direkten Effekt von HCMV beruht. Die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 (CD106) wurde mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper dargestellt. Als HCMV-negative Kontrolle dienten Schnitte aus der Tonsille. Hier wurde neben dem Endothel einiger Gefäße auch sehr schwach das Kryptenepithel angefärbt, von dem bekannt ist, dass es VCAM-1 exprimiert. In den HCMV-positiven Präparaten ließ sich in fast allen Fällen eine zarte Färbung ausmachen, die sich jedoch meist auf einzelne Gefäße beschränkte. Aus dem Vergleich aufeinanderfolgender Serienschnitte ging ein deutlicher Unterschied zwischen der Färbung des ICAM-1

Antigens und der VCAM-1 Färbung hervor, welcher sich in der Lokalisation der Signale, der gefärbten Zelltypen und der Intensität der Signale zeigte. Zelltypen die ein positives Signal für VCAM-1 zeigten waren vor allem Endothelzellen, daneben Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, Stromazellen (Abb.15B) und Trophoblasten (Abb.15B) in der Plazenta. Dies spricht für eine spezifische Färbung von VCAM-1.

4.3.1 VCAM-1 Expression auf Einzelzellebene in HCMV-infizierten Zellen

Um zu beantworten, ob HCMV einen direkten Effekt auf die VCAM-1 Expression in infizierten Zellen hat, wurde die VCAM-1 Expression auf Einzelzellebene in HCMV-infizierten Zellen analysiert. In Doppelfärbungen wurden hierfür im gleichen Schnitt simultan die sehr frühen Antigene von HCMV und VCAM-1 dargestellt. Auf Einzelzellebene konnte so die VCAM-1 Expression infizierter Zellen beurteilt werden. Es wurden auch Einfachfärbungen in nebeneinanderliegenden Serienschnitten mit Markierung von HCMV und VCAM-1 angefertigt (Abb.15) . Diese dienten in erster Linie dazu, Artefakte die durch eine Doppelfärbung entstehen könnten auszuschließen. Außerdem wurden bei Doppelfärbungen die unterschiedlichen Antigene, also das sehr frühe Antigen von HCMV und das Adhäsionsmolekül VCAM-1 in unterschiedlicher Reihenfolge angefärbt. Bei der Auswertung wurden wie bei der Untersuchung der ICAM-1 Expression HCMV-infizierten Zellen aufgesucht. Die VCAM-1 Expression HCMV-infizierter Zellen wurde dann im Vergleich zu umliegende nicht infizierten Zellen beurteilt. Auf Einzelzellebene war die Mehrzahl der HCMV-infizierten Zellen VCAM-1 negativ oder wies eine schwache VCAM-1 Expression auf, die sich jedoch nicht von der VCAM-1 Expression umgebender Zellen abhob (Abb.15) . Sehr vereinzelt gab es HCMV-infizierte Zellen, die ein schwach positives Signal für VCAM-1 zeigten, während in umgebenden Zellen kein Signal für VCAM-1 detektiert werden konnte. Insgesamt hatten diese Zellen einen Anteil von unter 1 % bezogen auf alle HCMV-infizierten Zellen. Darunter waren sowohl Stromazellen, Endothelzellen als auch Trophoblasten in der Plazenta. *In vivo* konnte eine deutliche VCAM-1 Mehrexpression in HCMV-infizierten Zellen nicht beobachtet werden. Aufgrund der insgesamt sehr zarten Färbung von VCAM-1 ist es möglich, dass eine schwache VCAM-1 Mehrexpression in HCVM-infizierten Zellen mit dieser Methode nicht detektiert wurde.

4.3.2 VCAM-1 Expression in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen

Der lokale Zusammenhang zwischen der HCMV-Infektion eines Gewebes und der VCAM-1 Expression in der Umgebung HCMV-positiver Zellen wurde wie auch schon im Falle von ICAM-1 vor allem in der Plazenta untersucht. Dort dienen die Zotten als einzelne, gut voneinander abgrenzbare Funktionseinheiten. HCMV-positive Zotten wurden aufgesucht, anschließend wurde dann die VCAM-1 Expression dieser HCMV-infizierten Zotten im Vergleich zu nichtinfizierten Nachbarzotten beurteilt.

In der Plazenta konnte auf Zottenebene hin und wieder ein lokaler Zusammenhang zwischen der HCMV-Infektion einer Zotte und der VCAM-1 Expression dieser Zotte beobachtet werden. Dieser war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie im Falle von ICAM-1. Nur ungefähr 20% aller HCMV-infizierten Zotten in der Plazenta zeigten eine Mehrexpression von VCAM-1, bezogen auf die gesamte Zotte und nicht allein auf die infizierten Zellen direkt (Abb.15) . Daran waren Stromazellen und zum Großteil Endothelzellen beteiligt, teilweise auch der Trophoblast.

4.4 ELAM-1 Expression in einzelnen HCMV-infizierten Zellen und in der Umgebung HCMV-positiver Zellen

Zusammenhänge von HCMV-Infektion und ELAM-1 Expression sollten sowohl auf der Ebene einzelner HCMV-infizierter Zellen untersucht werden, als auch in der Umgebung von HCMV-positiven Zellen. So sollte geklärt werden, ob die HCMV-Infektion direkt die Expression von ELAM-1 beeinflusst. Zusätzlich sollte beantwortet werden, ob in der Umgebung von HCMV-infizierten Zellen eine vermehrte ELAM-1 Expression beobachtet wird. Hierfür wurden Serienschnitte mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen humanes E-Selectin (E62E) angefärbt. Die Serienschnitte grenzten direkt an mit HCMV immediate-early-Antigen gefärbte Schnitte an. Auf diese Weise konnten die HCMV-infizierten Zellen aufgesucht werden und im angrenzenden Serienschnitt die ELAM-1 Expression in diesen Zellen direkt und in deren Umgebung beurteilt werden. Das Färbemuster von ELAM-1 stellte sich zart in Gefäßwänden (Abb.14) und in den Trophoblasten der Plazenta dar. Hin und wieder fanden sich adhärierende Leukozyten an den ELAM-1 gefärbten Gefäßwänden. Auf Einzelzellebene, sowie in der lokalen Umgebung gab es keine Korrelation zwischen HCMV-Infektion und ELAM-1

Mehrexpression (Abb.14). Vereinzelte HCMV-infizierte Zellen zeigten eine vermehrte ELAM-1 Färbung, der überwiegenden Großteil war jedoch ELAM-1 negativ. Es gab somit keinen Anhalt für eine Assoziation von ELAM-1 Expression in HCMV-infizierten Zellen direkt. In der Nähe von ELAM-1 exprimierenden Arealen fanden sich selten auch HCMV-infizierte Zellen (Abb.14). Auch hier gab es keine Korrelation zwischen HCMV-Infektion und ELAM-1 Expression in der Umgebung. Dies legt nahe, dass es weder in HCMV-infizierten Zellen direkt, noch in deren Umgebung einen Einfluss von einer HCMV-Infektion auf die ELAM-1 Expression gibt.

4.5 Verteilung von Leukozyteninfiltraten

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen HCMV-Infektion, Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 und Leukozyteninfiltraten in der Umgebung gibt. Um Leukozyteninfiltrate sichtbar zu machen wurden Färbungen mit Antikörpern gegen das „leucocyte common antigen“ (LCA) angefertigt. Dieser Zellmarker wird auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert (Janeway et al., 1999). Um die Leukozyteninfiltrate sowohl zu HCMV-infizierten Zellen als auch zur Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in Beziehung zu setzen, wurden in angrenzenden Serienschnitten der Plazenta LCA angefärbt. Durch die eindeutige Abgrenzbarkeit der Zotten der Plazenta untereinander konnten die Leukozyteninfiltrate eindeutig HCMV-positiven oder -negativen Zotten sowie stark oder schwach ICAM-1 bzw. VCAM-1 exprimierenden Zotten zugeordnet werden. Die LCA-Färbung zeigte ein zytoplasmatisches Signal. Viele der markierten Zellen lagen innerhalb der Lumina von Blutgefäße (Abb.8C). Allerdings fanden sich auch immer wieder im Stroma der Plazentazotten LCA-positive Zellen (Abb. 6C,7C). Diese Zellen waren sowohl einzeln oder als Infiltrat zu beobachten. Von den HCMV-infizierten Zotten waren etwa 75% im Stroma LCA-positiv (Abb.6-8). Dies zeigt, dass die HCMV-Infektion einer Zelle auch meist ein inflammatorisches Infiltrat nach sich zieht. Unter den LCA-negativen HCMV-positiven Zotten befinden sich auch früh HCMV-infizierte Zotten, wo die Immunantwort noch nicht weit fortgeschritten ist. Unter den umliegenden HCMV-negativen Zotten fanden sich auch etwa 65% LCA-positive Zotten. Hierunter fallen auch diejenigen Zotten, in denen durch die Immunantwort HCMV bereits eliminiert wurde. Während in fast allen ICAM-1-positiven Zotten auch mindestens 2 Leukozyten

im Stroma beobachtet wurden, waren etwa 80% der LCA-positiven Zotten auch ICAM-1-positiv. Es gab einige ICAM-1-negative Zotten mit Leukozyteninfiltrationen, jedoch kaum LCA-negative Zotten, die ICAM-1 exprimierten. Dies zeigt, dass ICAM-1 Expression und Leukozyteninfiltrate eng zusammenhingen und spricht insbesondere auch für die Funktionalität beim Rekrutieren von Leukozyten der angefärbten ICAM-1 Moleküle. Im Falle von VCAM-1 bot sich ein ähnliches Bild, wenn auch nicht ganz so deutlich ausgeprägt.

5 Diskussion

Der Hauptaspekt dieser Arbeit war zu untersuchen, ob *in vivo* das humane Cytomegalovirus einen direkten Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in seinen Wirtszellen hat. Die vorliegende immunhistochemische Analyse HCMV-infizierter Gewebe von akut infizierten Patienten zeigt, dass HCMV-infizierte Zellen im Vergleich zum umgebenden Gewebe keine erkennbare Mehrexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 aufweisen. Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle scheint somit *in vivo* keine direkte Modulation durch HCMV zu erfahren. Für alle untersuchten Adhäsionsmoleküle zeigte sich jedoch eine Mehrexpression in der Umgebung von Infektionsherden verglichen mit nicht infizierten Gewebsarealen. Da dies fast ausschließlich in Assoziation mit entzündlichen Infiltraten auftrat, handelt es sich vermutlich um eine indirekte Auswirkung der HCMV-Infektion.

In vitro gibt es teilweise gegensätzliche Berichte. In Zellkultursystemen wurde eine Hochregulierung von ICAM-1 in HCMV-infizierten Zellen von mehreren Autoren beschrieben. Untersucht wurden sowohl Endothelzellen (Sedmak et al., 1994, Waldman et al., 1998), als auch Fibroblasten (Craigen & Grundy, 1996, Grundy & Downes, 1993, Grundy et al., 1993, Ito et al., 1995), Lungenepithelzellen (Ibrahim et al., 1993), proximale Tubulusepithelzellen (van Dorp et al., 1993), Pigmentepithelzellen der Retina (Larcher et al., 1997) und Keratinozyten der Kornea (Stuart et al., 1997). Diese Hochregulierung wurde als direkter viraler Effekt postuliert, der nicht durch antivirale Therapie verhindert wird (Craigen & Grundy, 1996) und mit dem Fortschreiten der Virusreplikation zunimmt (Waldman et al., 1998). Die Mehrexpression von ICAM-1 in HCMV-infizierten Endothelzellen in Kultur betrug das 10-fache der ICAM-1 Expression nicht infizierter Endothelzellen (Sedmak et al., 1994). Im Gegensatz dazu änderte sich die VCAM-1-Expression in kultivierten Endothelzellen (Sedmak et al., 1994) und die VCAM-1 Expression in Pigmentepithelzellen der Retina (Larcher et al., 1997) nach Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus nicht. Für die ELAM-1-Expression ind Endothelzellkulturen existieren widersprüchliche Berichte (Larcher et

al., 1997, Scholz et al., 1996, Sedmak et al., 1994, Span et al., 1991), wobei die Mehrzahl der Autoren keinen Einfluss der HCMV-Infektion auf die ELAM-1-Expression in infizierten Zellkulturen fand. Während im Falle von VCAM-1 und ELAM-1 die *in-vivo*-Befunde der vorliegenden Arbeit mit den Zellkulturbefunden der meisten Autoren im Einklang sind, stehen die Ergebnisse zur ICAM-1 Expression in HCMV-infizierten Zellen im Gegensatz zu Kulturergebnissen. Diese Diskrepanzen können auf verschiedenen Faktoren beruhen. Kultivierte Zellen unterscheiden sich in vielen Punkten von Zellen *in vivo*, daher können sie sich auch anders verhalten. Die verwendeten Laborstämme von HCMV unterscheiden sich genetisch vom Wildtyp (Mocarski, 1993), so könnten unterschiedliche Eigenschaften der verschiedenen HCMV-Stämme ein unterschiedliches Verhalten der Kulturstämme, verglichen mit dem Wildtyp, bedingen. *In vivo* liegt eine wesentlich komplexere Situation vor. Während Kulturansätze sich meist auf ein oder zwei Zelltypen beschränken, haben *in vivo* eine Vielzahl von Zellen, Cytokinen und anderen Faktoren Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle. Durch solch unterschiedliche Einflüsse könnte ein *in vitro* vorhandener Effekt von HCMV auf die Expression von Adhäsionsmolekülen *in vivo* überlagert werden. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wird ohnehin im Zuge einer normal ablaufenden Immunreaktion auf das Virus stimuliert. Diese Stimulation der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 könnte auch auf nicht infizierte Zellen stark genug sein, dass eventuell vorhandene direkte Effekte auf infizierte Zellen durch HCMV daneben nicht hervortreten. Ein weiterer Hinweis gegen die direkte HCMV-induzierte Mehrexpression von ICAM-1 oder VCAM-1 fand sich in solchen HCMV-positiven Arealen, die keine Expression von ICAM-1 oder VCAM-1 in nicht infizierten Zellen aufwiesen. Dort zeigten HCMV-infizierte Zellen fast nie eine ICAM-1 oder VCAM-1 Expression.

Während also auf Einzelzellebene ein Effekt von HCMV auf die ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 Expression in infizierten Zellen nicht nachweisbar war, wurde häufig in HCMV-infizierten Gewebearealen eine deutliche Mehrexpression besonders von ICAM-1 und VCAM-1 beobachtet. Diese fand sich in nicht infizierten Zellen in der Umgebung von HCMV-positiven Zellen. Am besten konnte dies in der Plazenta nachvollzogen werden, da dort die Zotten voneinander abgegrenzte Einheiten bilden, so dass man dort die Beziehung zwischen HCMV-Infektion und

Adhäsionsmolekülexpression in derselben Zotte am besten nachvollziehen kann. Allerdings fand sich auch in allen übrigen Organen eine häufige Kolokalisation von HCMV-Infektion und einer vermehrten ICAM-1 und auch VCAM-1 Expression in denselben Gewebearealen, aber nicht auf Einzelzellebene. Im Falle von ELAM-1 ließ sich auf lokaler Ebene keine eindeutige Korrelation feststellen. Dies ist möglicherweise auf die nur transiente ELAM-1 Expression in Endothelzellen zurückzuführen. Bisherige hierzu veröffentlichte *in vivo*-Daten bezogen sich auch auf lokale Infektionsherde oder auf gesamte Organe, ohne jedoch gezielt auf Einzelzellebene infizierte Zellen zu untersuchen. In Biopsien von Herztransplantaten wurde bei Patienten während dokumentierter HCMV-Infektion eine deutlich höhere VCAM-1 Expression und eine dezente ELAM-1 Expression gefunden verglichen mit HCMV-negativen Patienten (Allen et al., 1996). Der Anstieg der VCAM-1 Expression fand in zeitlichem Bezug zum Beginn der HCMV-Antigenämie statt (Koskinen, 1993). Eine Modulation der ICAM-1 Expression wurde in dieser Analyse nicht beobachtet. In Biopsien aus Lebertransplantaten von Patienten mit klinischer HCMV-Infektion wurde eine ICAM-1 Induktion beobachtet, vor allem in vaskulären und sinusoidalen Endothelzellen (Lautenschlager et al., 1996) und in Hepatozyten (Einsele et al., 1994). Eine ICAM-1 Hochregulierung wurde allerdings auch bei HCMV-negativen Patienten mit Transplantatabstoßung oder bakterieller Sepsis detektiert. Des weiteren wurde eine VCAM-1 Induktion sowohl bei HCMV-positiven als auch -negativen Patienten mit Transplantatabstoßung beschrieben (Lautenschlager et al., 1996). Die beobachtete lokale Mehrexpression von ICAM-1 und VCAM-1 in HCMV-infizierten Gewebearealen findet sich im Einklang mit den bisherigen *in vivo* Ergebnissen. Da in HCMV-infizierten Zellen selbst keine Hochregulierung der ICAM-1, VCAM-1 oder ELAM-1 Expression stattfindet, scheint es sich dabei nicht um einen direkten Effekt von HCMV zu handeln. Es ist jedoch gut möglich, dass die Mehrexpression von ICAM-1 und VCAM-1 in der Umgebung HCMV-infizierter Zellen im Zuge der physiologischen Immunantwort gegen HCMV zustande kommt. Dafür spricht außerdem, dass in ICAM-1 positiven Gewebearealen, etwas weniger deutlich auch in VCAM-1 positiven Arealen, fast immer Leukozyteninfiltrate vorhanden waren.

Grundsätzlich könnte auch eine zu niedrige Sensitivität des immunhistochemischen Nachweisverfahrens die Diskrepanz zwischen den vorliegenden in-vivo-Befunden und

den Literaturberichten über eine Hochregulierung von ICAM-1 in infizierten Zellen erklären. Durch die Einbeziehung von Positiv-und Negativ-Kontrollen, insbesondere aber durch die entsprechende Wertung interner Kontrollen kann dies jedoch nahezu ausgeschlossen werden. Anforderungen an die Methode waren, dass untersuchte Antigene spezifisch und mit ausreichender Empfindlichkeit nachweisbar sind. Kontrollen der Färbung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 wurden in HCMV-negativen und –positiven Geweben durchgeführt. Heterogenität sowohl bei der Verteilung des Signals, als auch bei der Intensität der Färbung und eindeutige Endothelassoziation waren Hauptkriterien für das Vorliegen einer spezifischen Anfärbung. Daneben war wichtig, dass ausschließlich Zelltypen gefärbt waren, die bekannterweise das jeweils untersuchte Adhäsionsmolekül exprimieren. Zusätzlich wurden Färbungen mit verschiedenen Antikörperklonen angefertigt und verglichen. Die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1wurde somit spezifisch erfasst. Die Zuverlässigkeit der HCMV-Färbung wurde in HCMV-positiven Präparaten überprüft. Mit dem Klon E13 lag ein in der Immunhistochemie sehr gut ausgetesteter Antikörper gegen das immediate-early-Antigen von HCMV vor. In HCMV-positiven Geweben fanden sich rein zellkerngebundene Signale. Unter den markierten Zellen waren auch sogenannte „Eulenaugenzellen“, die spät infizierte HCMV-positive Zellen darstellen. Somit wurden spezifisch die HCMV-infizierten Zellen erfasst. Des weiteren war es wichtig sicherzustellen, ob auch Intensitätsunterschiede in der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 mit ausreichender Empfindlichkeit erfasst wurden. Die ICAM-1 Expression infizierter Endothelzellen in Kultur unterschied sich von der Expression nicht infizierter Kulturen um das zehnfache (Sedmak et al., 1994), ein solcher Effekt wäre auf jeden Fall detektiert worden. In jedem Präparat konnten dezente Abstufungen der ICAM-1 Expression in verschiedenen Zellen beobachtet werden. In der Umgebung HCMV-infizierter Zellen fanden sich meist ein oder mehrere nicht infizierte Zellen, die eine stärkere ICAM-1 Expression aufwiesen als infizierte Zellen. In allen VCAM-1 gefärbten Präparaten fanden sich nicht HCMV-infizierte Zellen mit deutlicher Markierung von VCAM-1. Wie auch im Fall von ICAM-1 konnten meist nicht infizierte Zellen mit stärkerer VCAM-1 Expression, verglichen mit HCVM-infizierten Zellen, beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass Intensitätsunterschiede in der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 mit ausreichender

Empfindlichkeit detektiert werden konnten. Allerdings waren die VCAM-1 Färbungen sehr dezent, so dass geringfügige Differenzen eventuell nicht erfasst werden konnten. Passagere Effekte, wie die Hochregulierung eines Adhäsionsmoleküls ausschließlich in einer bestimmten Phase des Replikationszyklus wurden ausgeschlossen durch die Verwendung von Antikörpern gegen das „immediate early" Antigen von HCMV, welches infizierte Zellen in allen Stadien der Virusreplikation markiert. Bei *in vivo* Untersuchungen müssen zusätzliche Einflüsse auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bedacht werden, wie zusätzliche Pathogene oder Therapieeinflüsse. In dieser Arbeit wurden Gewebeproben unterschiedlicher Patienten mit verschiedenen Grundkrankheiten verwendet. Es bot sich in allen untersuchten Gewebeproben etwa das gleiche Bild. Nennenswerte Unterschiede der ICAM-1 oder VCAM-1 Expression infizierter Zellen konnten zwischen den einzelnen Präparaten nicht festgestellt werden. Der Plazenta kommt hierbei eine wichtige Bedeutung zu. Bei der HCMV-Plazentitis spielen andere Pathogene kaum eine Rolle, auch wird die HCMV-Plazentitis nicht antiviral behandelt. Eine Mehrexpression von ICAM-1 oder VCAM-1 in HCMV-infizierten Zellen konnte nicht beobachtet werden. Die Übereinstimmung der Befunde in den Geweben aller akut HCMV-infizierter Patienten, sowie in den intrauterin infizierten Plazenten spricht gegen eine Verfälschung der Ergebnisse durch zusätzliche Einflüsse, wie andere Pathogene oder medikamentöse Therapie. Gestützt werden diese Ergebnisse noch durch neuere Zellkultur-Untersuchungen auf mRNA-Ebene. In HCMV-infizierten Fibroblasten wurde keine vermehrte Transkription der Gene von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 gefunden. (Browne et al., 2001)

Interaktionen zwischen dem humanen Cytomegalovirus und dem Immunsystem seines Wirtes kommen eine wichtige Bedeutung zu bei der Frage, durch welche Mechanismen das Virus Einfluss auf Entzündungsreaktionen hat. Bei HCMV-positiven Patienten scheinen Transplantatabstoßungen und progressive Gefäßsklerose des Transplantats signifikant häufiger aufzutreten (Waldman, 1998). Auch wurden manche Organschäden, besonders in der Lunge, eher auf Infiltrate mit Entzündungszellen zurückgeführt, als auf Läsionen durch das Virus direkt (De Jong et al., 1998, Fishman & Rubin, 1998). Dies wirft die Frage auf, ob HCMV immunstimulatorische Eigenschaften besitzt, zum Beispiel über eine Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und

ELAM-1, die am Gefäßendothel zu einer Leukozytenrekrutierung führen. Eine Induktion von Adhäsionsmolekülen durch HCMV in infizierten Zellen würde diese zu einem Fokus für Immunzellen machen und somit der Elimination des Virus aus dem Organismus zuträglich sein. Daraus ergäbe sich ein entscheidender Nachteil für Vermehrung und Verbreitung des humanen Cytomegalovirus. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Infiltration infizierter Gewebeareale durch Entzündungszellen sehr wahrscheinlich nicht auf eine direkte Hochregulierung der Expression der Adhäsionsmoleküle durch HCMV in den infizierten Zellen selbst zurückzuführen ist. Allerdings wurde eine lokale Erhöhung der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und auch ELAM-1 in HCMV-positiven Gewebearealen gezeigt. Dies ist erklärbar als ein normaler Vorgang im Zuge der Immunantwort gegen HCMV. So stellen beispielsweise die Natürlichen Killerzellen, Zellen der unspezifischen Abwehr, einen wichtigen Faktor der frühen antiviralen Abwehr dar. Sie werden aktiviert durch niedrige MHC I Expression auf der Zelloberfläche. Die MHC I Expression wird in HCMV-infizierten Zellen inhibiert (Hengel et al., 1998, Waldman et al., 1998). In aktiviertem Zustand schütten Natürliche Killerzellen vor allem Interferon-γ aus. Auch CD8-positive T-Lymphozyten, Zellen der spezifischen Immunabwehr schütten bei der Erkennung ihrer Zielzelle, zum Beispiel einer HCMV-infizierten Zelle, die Cytokine IFN-γ und TNF-α aus. IFN-γ und TNF-α gehören zu den wichtigsten Induktoren für die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. (Janeway et al., 1999) Diese These zur Entstehung der lokalen Mehrexpression von ICAM-1 und VCAM-1 in HCMV-positiven Arealen wird untermauert durch die Verteilung der Leukozyteninfiltrate in der Plazenta. Da sehr selten ICAM-1 und auch VCAM-1-positive Zotten beobachtet wurden, in denen sich keine Leukozyten im Gewebe fanden, deutet dies auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Leukozyteninfiltraten und der vermehrten Expression dieser beiden Adhäsionsmoleküle hin. Im Zuge einer physiologischen Immunantwort kommt es also auf unterschiedlichen Wegen zu einer Induktion der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. So könnte, selbst wenn Patienten immunsuppressiv behandelt werden oder durch eine Immunschwäche eine Komponente des Immunsystems versagt, die Induktion dieser Adhäsionsmoleküle gewährleistet bleiben. Eine vermehrte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 lenkt unselektiv Immunzellen in das Gewebe. HCMV-infizierte Transplantate werden somit

nicht nur von Immunzellen infiltriert, die HCMV-infizierte Zellen bekämpfen, sondern auch von anderen Immunzellen, die beispielsweise gegen allogenes Gewebe gerichtet sein können. Auf diese Weise könnten Abstoßungsreaktionen und andere immunpathologische Vorgänge verstärkt und begünstigt werden. Die Analysen der infiltrierenden T-Lymphozyten im Modell der MCMV-assoziierten Pneumonie Knochenmarktransplantierter Mäuse widerspricht jedoch einer solchen Hypothese, denn die cytotoxischen T-Zellen waren gegen MCMV gerichtet und nicht gegen körpereigene Antigene. Möglicherweise könnten auch Endothel-Läsionen durch das Virus eine Rolle spielen. *In vitro* können Endothelzellen durch HCMV lytisch infiziert werden; *in vivo* würde dieser Vorgang zu Läsionen in der Endothelschicht führen, die wiederum Thrombozytenaggregationen, Leukozytenrekrutierung und –migration nach sich ziehen und auf lange Sicht zu Vaskulitis und Atherosklerose führen können (Kahl et al., 2000), wie sie bei der progressiven Gefäßsklerose bei der chronischen Transplantatabstoßung beobachtet wird. Immunpathologische Vorgänge im Zusammenhang mit einer HCMV-Infektion sind nicht immer auf direkte virale Effekte zurückzuführen. Im Falle der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM,-1 und ELAM-1 wurde gezeigt, dass deren Expression nicht mit der HCMV-Infektion einer Zelle korreliert. Es dominiert vielmehr eine ICAM-1 und VCAM-1 Hochregulierung im Sinne einer Umgebungs- bzw. Immunreaktion in der Nähe HCMV-infizierter Zellen.

Insgesamt zeigt die vorliegende Untersuchung, dass zwar die entzündlichen Infiltrationen in HCMV-infiziertem Gewebe mit einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 einhergehen, dass aber die infizierten Zellen selbst nicht verstärkt diese Adhäsionsmoleküle exprimieren. Die Hypothese, dass in der Posttransplantations-Situation HCMV-infizierte Endothelzellen über eine Hochregulierung von ICAM-1 zu einer unspezifischen Leukozyten-Infiltration in umliegende Gewebe und so zur Etablierung einer Alloreaktivität führen, wird durch diese Arbeit nicht gestützt. Vielmehr scheint das Virus - durchaus im Sinne seines eigenen biologischen Vorteils - in seinen Zielzellen zu replizieren ohne solche Signale für eine Immunstimulation zu induzieren. Die erhöhte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 in der Umgebung von Infektionsherden zeigt jedoch an, dass diese virale Strategie zur Vermeidung einer Entzündungsreaktion nicht erfolgreich ist. Ob dieses Expressionsmuster allein durch die Infektion ausgelöst werden kann,

beispielsweise durch Cytokine aus infizierten Zellen, oder aber erst in Folge einer anderweitig gesteuerten Immunreaktion zustande kommt, kann die immunhistochemische Analyse naturgemäß nicht beantworten. Dies werden zukünftige Arbeiten in Zellkultur oder Tiermodell klären müssen.

6 Zusammenfassung

Einflüsse des humanen Cytomegalovirus auf die Immunantwort des Wirtes werden vielfältig diskutiert. Das gehäufte Auftreten von Transplantatabstoßungen bei HCMV-Patienten wirft die Frage auf, ob HCMV immunstimulatorische Eigenschaften besitzt. So wurde *in vitro* eine Hochregulierung von ICAM-1 in HCMV-infizierten Zellen beschrieben. ICAM-1 und VCAM-1 sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle für die Adhäsion von Immunzellen am Endothel und deren Migration ins Gewebe. *In vivo* lagen jedoch bisher keine Daten auf Einzelzellebene vor, die eine Übertragung der Kulturergebnisse auf die physiologische Situation beim Menschen erlaubten.

In dieser Arbeit wurden Gewebeschnitte von mehreren akut HCMV-infizierten Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen und aus verschiedenen Organen immunhistochemisch untersucht. Mittels monoklonaler Antikörper wurde das immediate-early-Antigen von HCMV, das in allen Phasen des Replikationszyklus des Virus detektierbar ist, und die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 dargestellt. Durch Doppelfärbungen oder durch Einzelfärbungen aneinander grenzender Serienschnitte konnte die Expression dieser Adhäsionsmoleküle in HCMV-infizierten Zellen selbst und auch in der Umgebung HCMV-positiver Zellen beurteilt werden. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche lokale ICAM-1 und VCAM-1 Mehrexpression in der Umgebung von HCMV-infizierten Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Gewebe-arealen. Diese Beobachtungen, die vor allem in den Zotten der Plazenta gemacht wurden, ließen sich auch in anderen Organen nachvollziehen. Dies ist erklärbar im Rahmen der physiologischen Immunantwort gegen HCMV, bei der mehrere Cytokine, die nach Erkennen einer virusinfizierten Zelle freigesetzt werden, eine Induktion von ICAM-1 und VCAM-1 verursachen können. Auf Einzelzellebene wurde jedoch fast nie eine Mehrexpression von ICAM-1 in HCMV-infizierten Zellen selbst im Vergleich zu nicht infizierten Nachbarzellen gefunden. Auch VCAM-1 und ELAM-1 wurden in der überwiegenden Mehrzahl der HCVM-infizierten Zellen nicht stärker exprimiert als in HCMV-negativen Zellen der Umgebung. Diese Ergebnisse zeigten sich durchgehend in allen Organen und Zelltypen. Auch eine vorübergehende Hochregulierung von ICAM-1 oder VCAM-1 in Abhängigkeit vom Replikationszyklus von HCMV konnte nicht

belegt werden. Das humane Cytomegalovirus hat demnach *in vivo* keinen direkten Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 in HCMV-infizierten Zellen.

HCMV scheint nicht über eine direkte Hochregulierung der Expression der Adhäsionsmoleküle in HCMV-infizierten Zellen immunstimulatorisch zu wirken und dadurch Transplantatabstoßungen, sowie Gewebeschäden zu begünstigen. Allerdings deutet die lokale Mehrexpression von ICAM-1 und VCAM-1 in HCMV-positiven Arealen darauf hin, dass solche immunpathologischen Vorgänge im Zuge der physiologischen Immunantwort gegen das humane Cytomegalovirus gefördert werden können. Über die unspezifische Rekrutierung von Immunzellen durch die Adhäsionsmoleküle können auch verstärkt gegen fremde Zellen des Transplantats gerichtete Immunzellen ins Gewebe gelangen und somit auch Abstoßungsreaktionen begünstigen.

7 Bildanhang

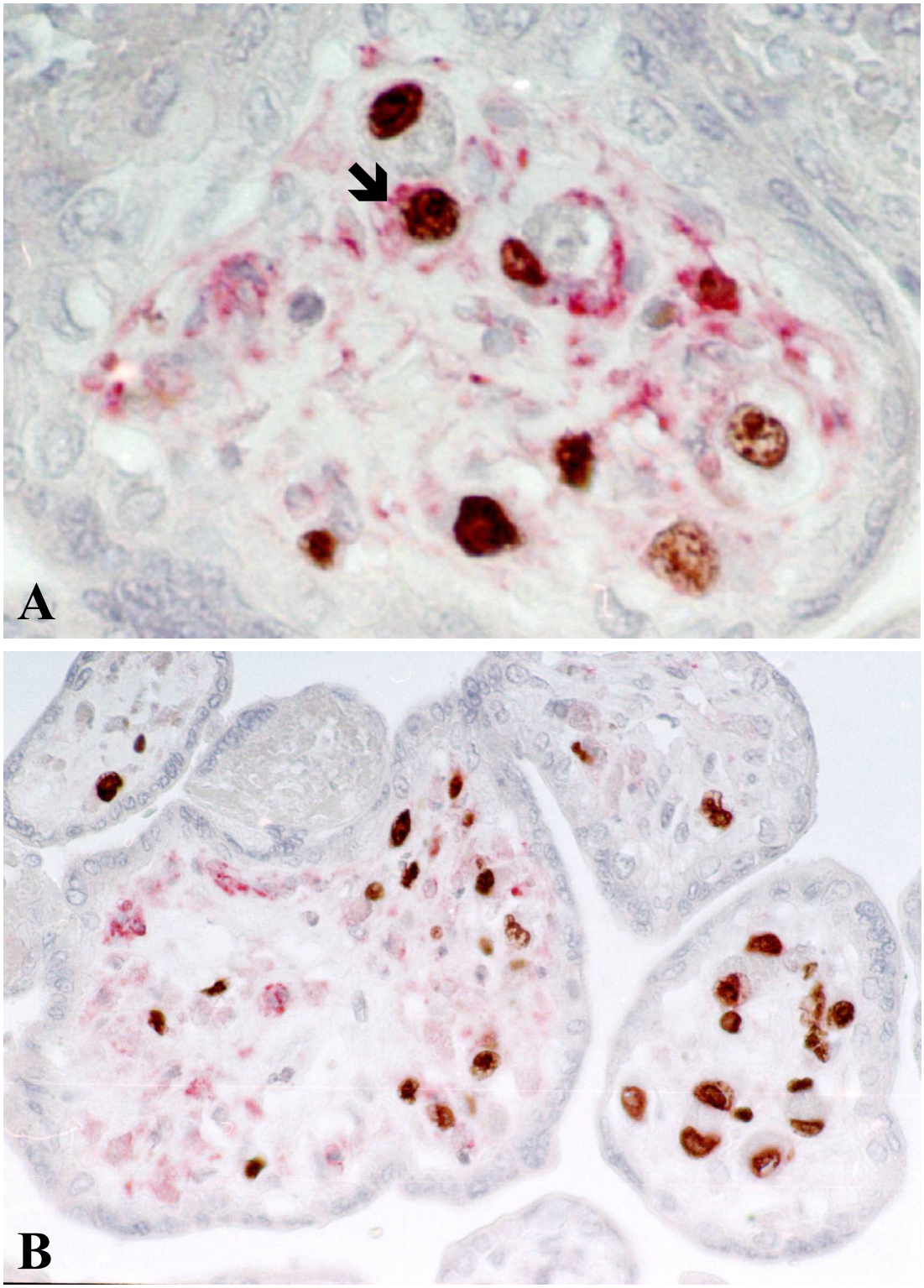


Fig. 1 A, B. Darstellung von HCMV-infizierten Zellen und ICAM-1 Expression in der Plazenta. Es wurde das immediate-early-Antigen von HCMV mit der Immunperoxidase Methode dargestellt (braune Zellkerne) und ICAM-1 durch Färbung mit alkalischer Phosphatase (rotes Zytoplasma). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A** Man erkennt im Schnitt durch eine Plazentazotte mehrere HCMV-infizierte Zellen, nur eine davon (Pfeil) weist eine auffallende ICAM-1 Expression auf. In der Umgebung deutliche Expression von ICMA-1. Vergrößerung 1000x. **B** Es sind mehrere Anschnitte von HCMV-infizierten Plazentazotten zu sehen. Während die HCMV-infizierten selbst keine sichtbare ICAM-1 Expression aufweisen, exprimieren in der größeren Zotte links im Bild einige nicht infizierte Zellen deutlich ICAM-1. In den anderen Anschnitten ist ICAM-1 nicht detektierbar. Vergrößerung 250x.

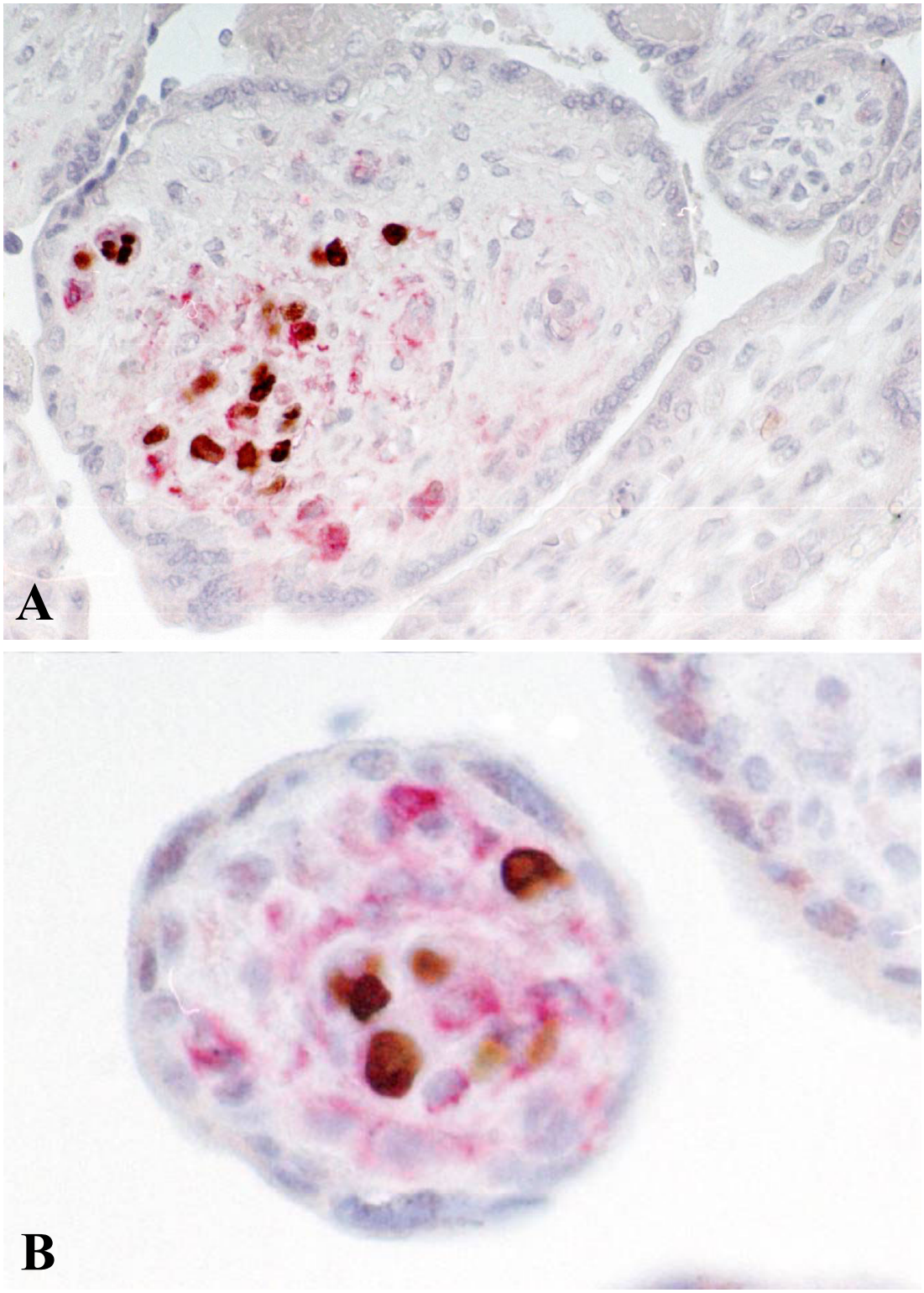


Fig. 2 A, B. In der Plazenta Darstellung von HCMV immediate-early-Antigen mit Immunperoxidase-färbung (braune Zellkerne) und ICAM-1 durch alkalische Phosphatasefärbung (rotes Zytoplasma) . Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A** (Vergrößerunng 250x) **und B** (Vergrößerung 1000x) zeigen Schnitte durch Plazentazotten mit jeweils mehreren HCMV-infizierten Zellen, von denen einzelne ICAM-1 exprimieren, jedoch nicht stärker als die umgebenden Zellen. Deutliche ICAM-1 Expression in einigen umliegenden nicht infizierten Zellen.

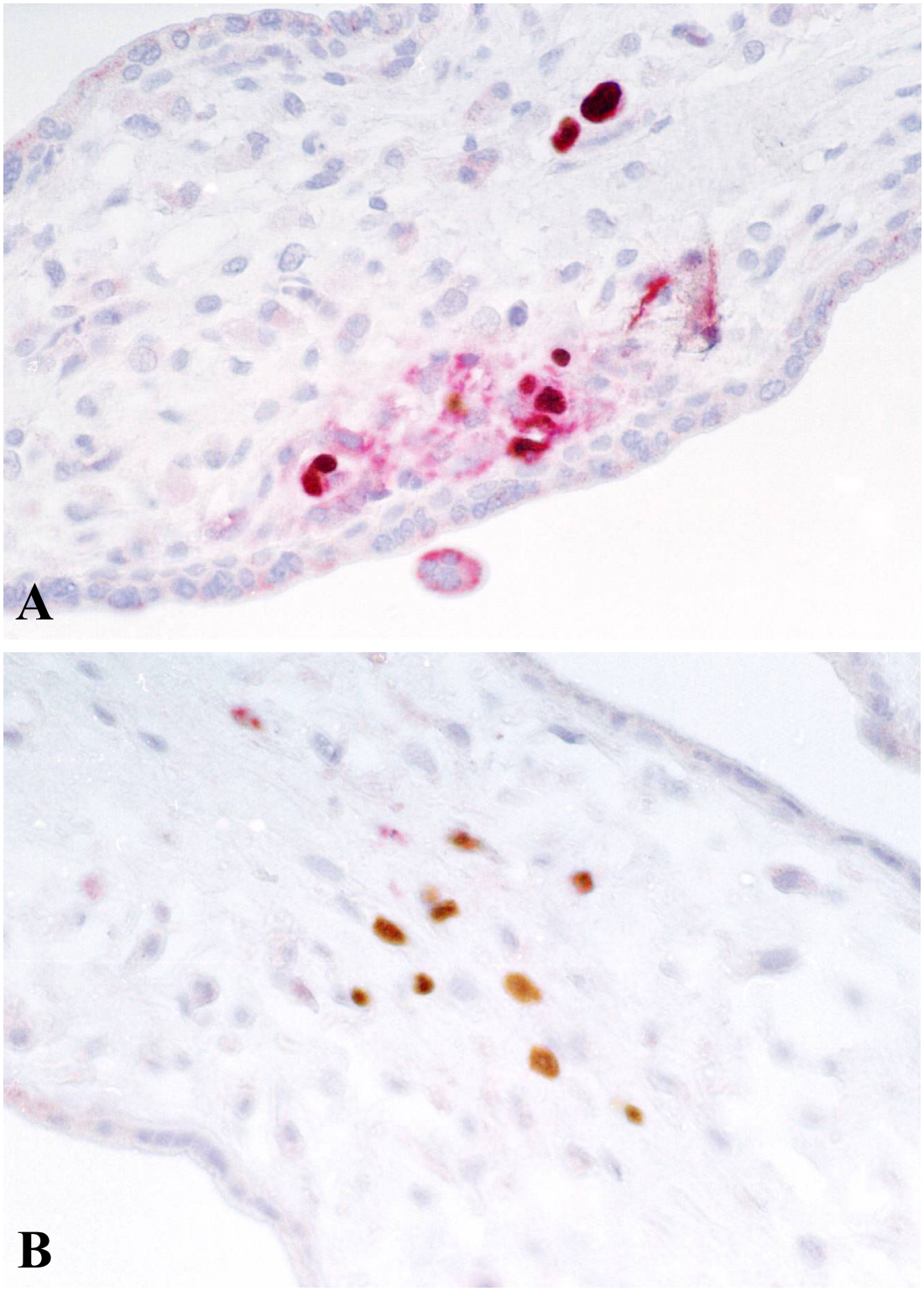


Fig. 3 A, B. Darstellung von HCMV immediate-early-Antigen mit Immunperoxidasefärbung (braune Zellkerne) und ICAM-1 durch alkalische Phosphatasefärbung (rotes Zytoplasma) in Zotten der Plazenta. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A** HCMV-infizierte Zellen mit deutlicher ICAM-1 Expression, jedoch im Rahmen der Umgebungsreaktion erklärbar. **B** HCMV-infizierte Zellen ohne detektierbare ICAM-1 Expression, auch in der Umgebung keine sichtbare ICAM-1 Expression. Vergrößerung in beiden Bildern 250x.

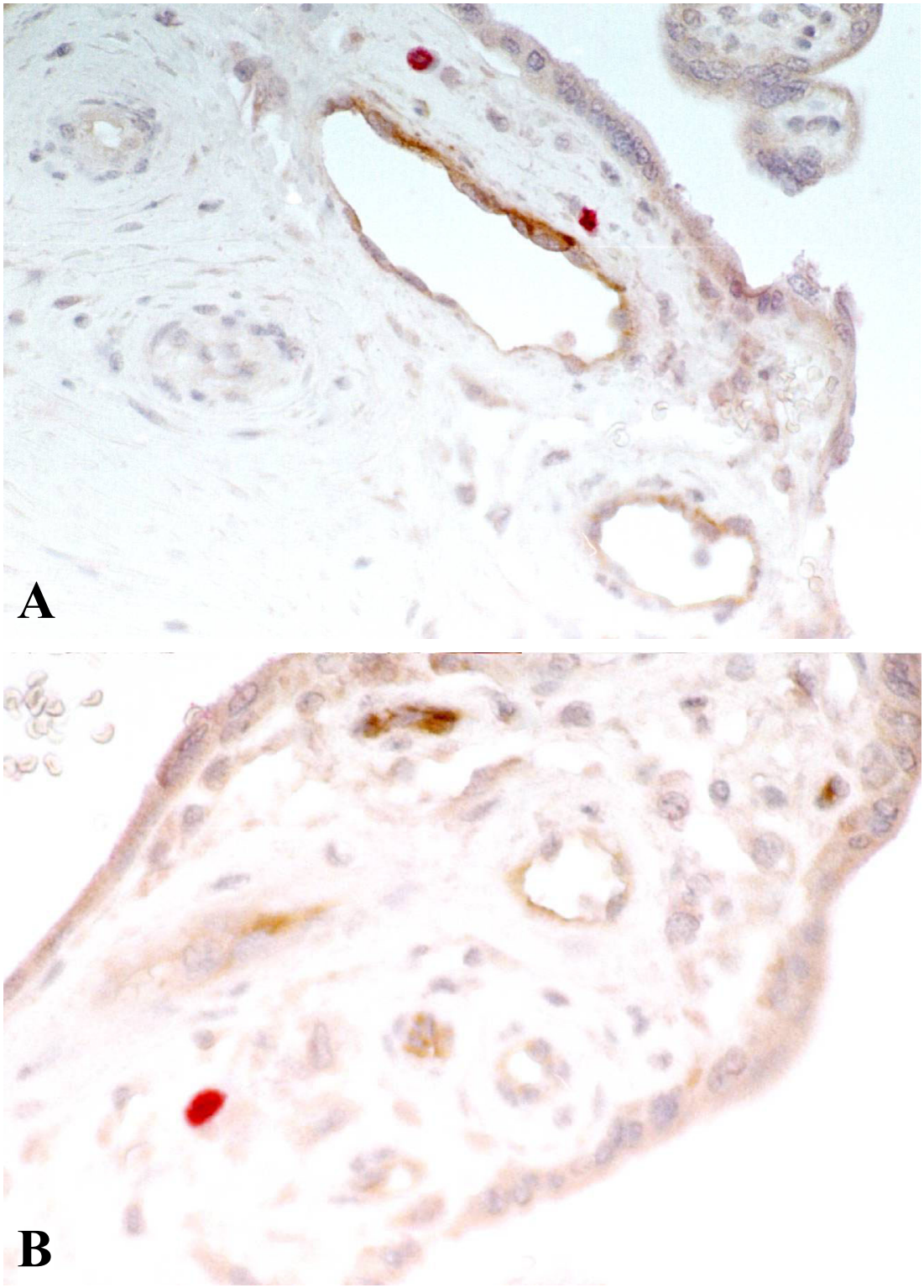


Fig. 4 **A, B.** In Zotten der Plazenta Darstellung von HCMV-infizierten Zellen durch alkalische Phosphatase Färbung des immediate-early-Antigen von HCMV (rote Zellkerne) und Markierung von ICAM-1 durch Immunperoxidasefärbung (braunes Zytoplasma). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A + B** Die HCMV-infizierten Zellen weisen selbst keine sichtbare ICAM-1 Expression auf, jedoch auffallend ist die deutliche ICAM-1 Expression v.a. der Endothelzellen nahe gelegener Gefäße. Vergrößerung jeweils 250x.

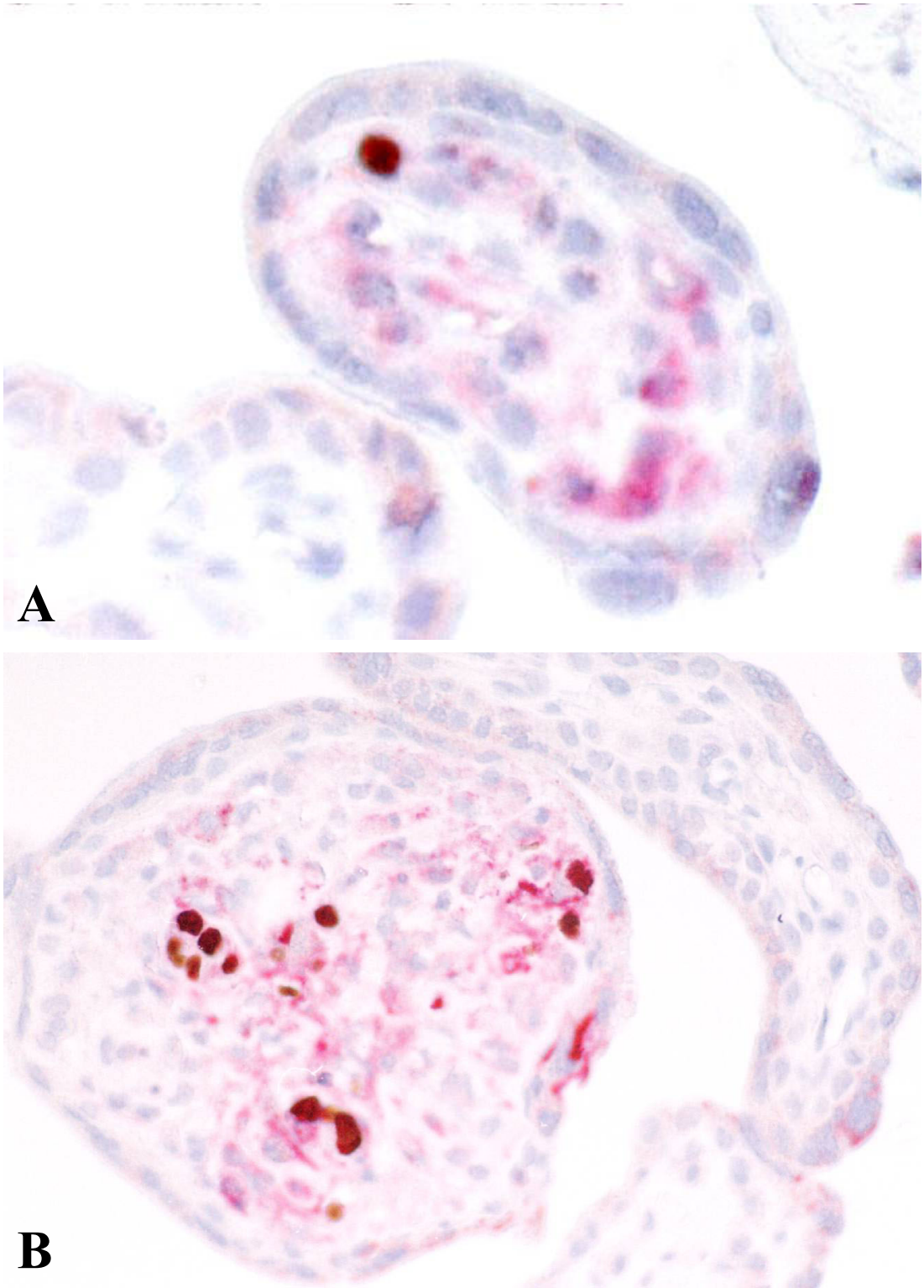


Fig. 5 A, B. Darstellung des immediate-early-Antigen von HCMV durch Immunoperoxidase Färbung (braune Zellkerne) und durch zusätzliche Färbung mit alkalischer Phosphatase Markierung von ICAM-1 (rotes Zytoplasma) in der Plazenta. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A** Einzelne HCMV-infizierte Zelle ohne erkennbare ICAM-1 Expression. Im Vergleich zu danebenliegenden nicht infizierten Zotten jedoch deutliche Mehrexpression von ICAM-1 in dieser HCMV-positiven Zotte. Vergrößerung 1000x. **B** Plazentazotte mit mehreren HCMV-infizierten Zellen, die teils ICAM-1 negativ, teils ICAM-1 positiv in ähnlichem Maße wie nicht infizierte Zellen der Umgebung sind. Auffallend deutliche ICAM-1 Mehrexpression der HCMV-positiven Zotte im Vergleich zu nicht infizierten Nachbarzotten. Vergrößerung 250x.

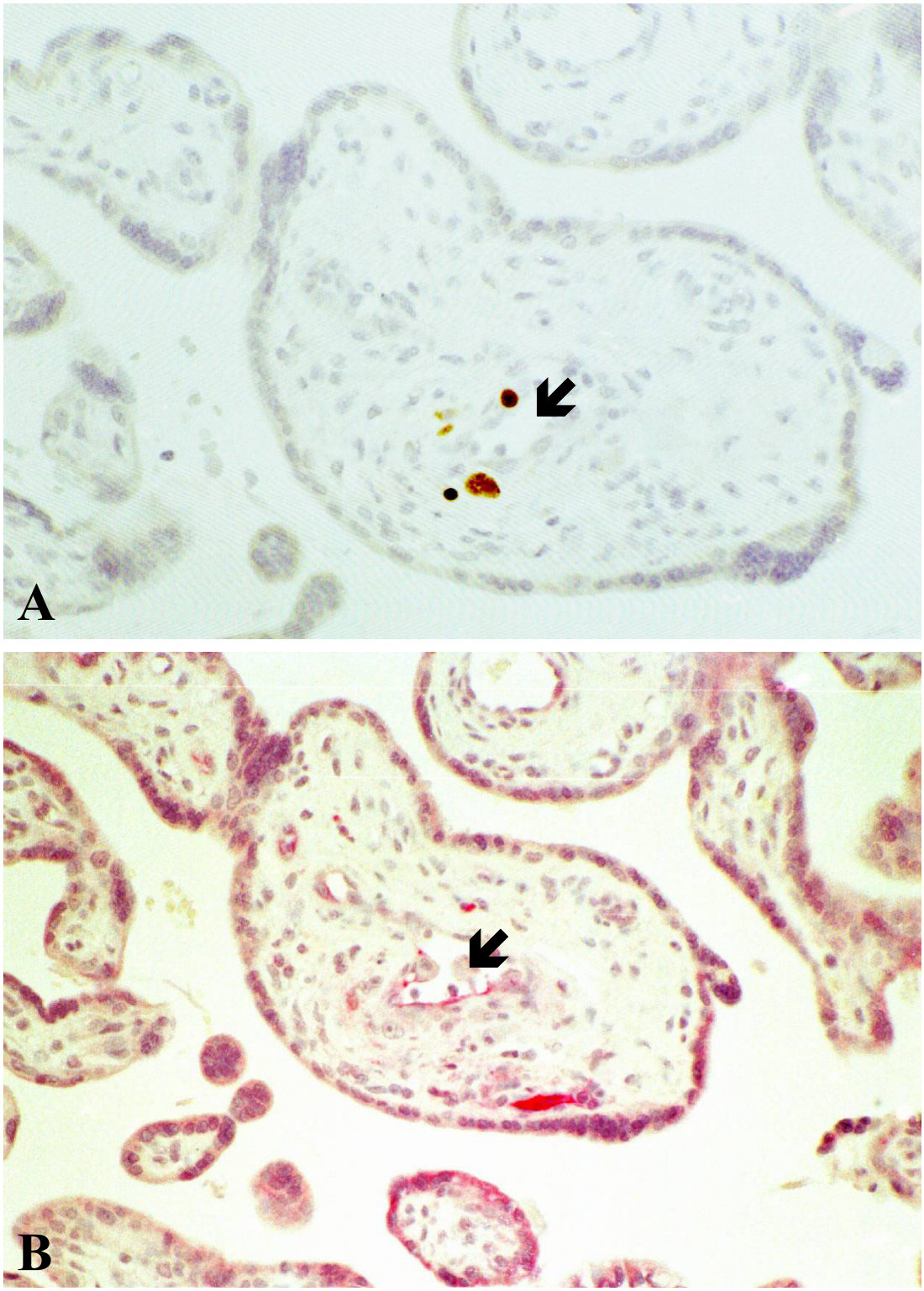
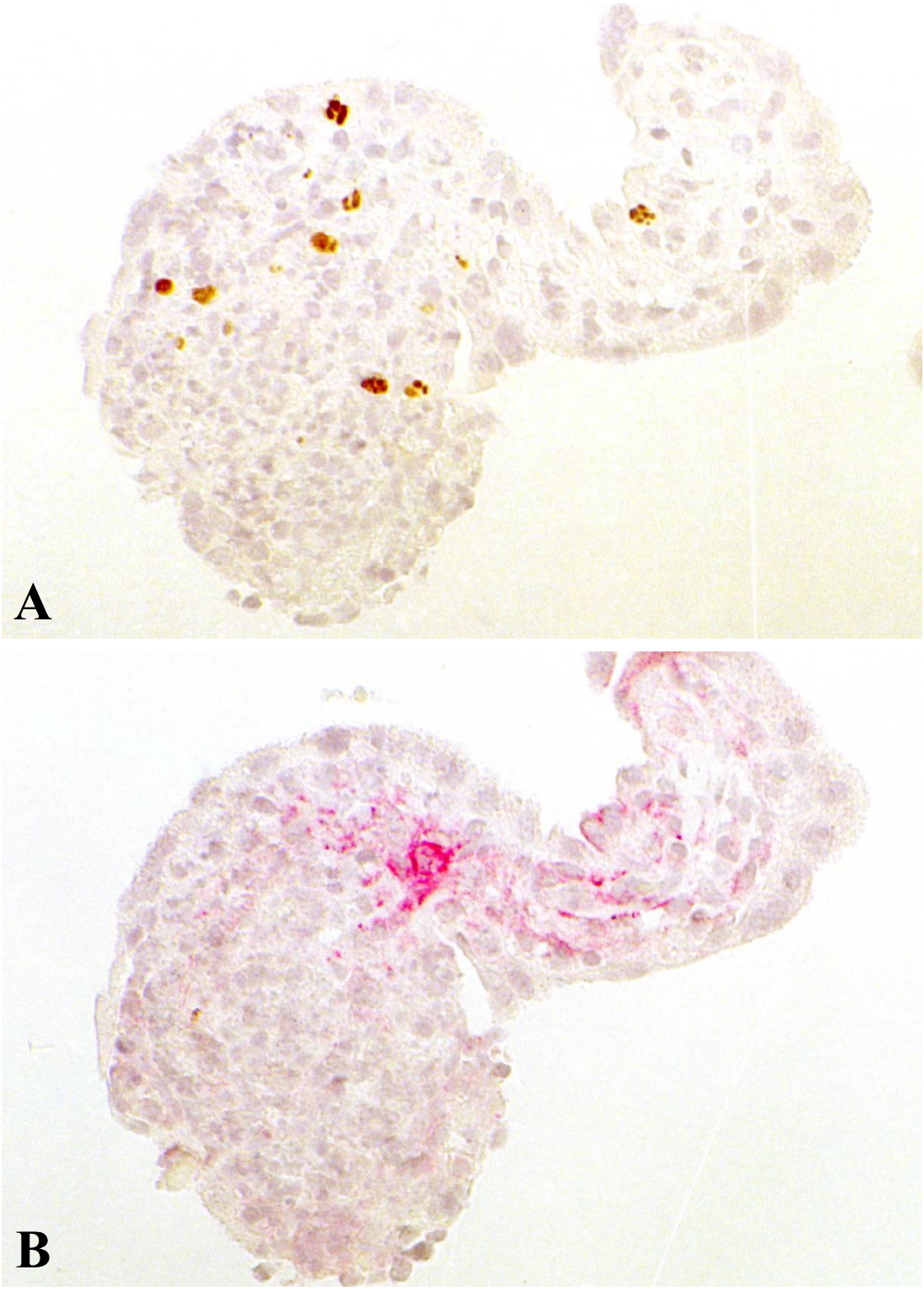

A
B

Fig. 6 A-C. Zusammenhang zwischen HCMV-Infektion , ICAM-1 Expression und Leukozytenadhäsion in HCMV-positiver Plazenta. **A-C** zeigen jeweils die gleiche Stelle im Gewebe derselben Plazentazotte in aneinandergrenzenden Serienschnitten.(Dicke 4 µm).Die Gegenfärbung wurde in allen Schnitte mit Hämatoxylin durchgeführt. Vergrößerung in allen Schnitte: 1000x. **A** Das immediate-early-Antigen von HCMV wurde durch Immun-Peroxidase-Färbung dargestellt. HCMV-positive Zellen zeigen eine braune Zellkernfärbung. Im Zentrum der Zotte liegt ein Blutgefäß (der Pfeil zeigt auf das Lumen.), darum herum drei HCMV-positive Zellen. **B** Es ist in einem angrenzendem Serienschnitt die selbe Zotte wie in A dargestellt. Das ICAM-1 Antigen wurde immunhistochemisch durch Alkalische Phosphatase-Färbung detektiert, welche zu einer roten zytoplasmatischen Färbung führt. Die HCMV-positiven Zellen weisen selbst keine vermehrte ICAM-1 Expresssion im Vergleich zu ihrer Umgebung auf. Die Blutgefäße in dieser Zotte, sowie die Trophoblasten und auch einzelne Stromazellen zeigen eine intensive ICAM-1 Färbung. Im Lumen (Pfeil) des oben beschriebenen Blutgefäßes erkennt man einige adhärierende Zellen. **C** In einem weiteren angrenzenden Serienschnitt wird dieselbe Zotte gezeigt. Hier wurde das Leukozyten Antigen (LCA) immunhistochemisch durch Alkalische Phosphatase-Färbung dargestellt, welche zu einer roten zytoplasmatischen Färbung führt. In der Mitte des Bildes liegt das in A und B beschriebene Blutgefäß (Pfeilspitze im Lumen). An den Wänden des Gefäßes sind deutlich durch diese Färbung die adhärierenden Zellen als Leukozyten identifiziert. Auch im Zottenstroma liegen einige eingewanderte Leukozyten.


A
B

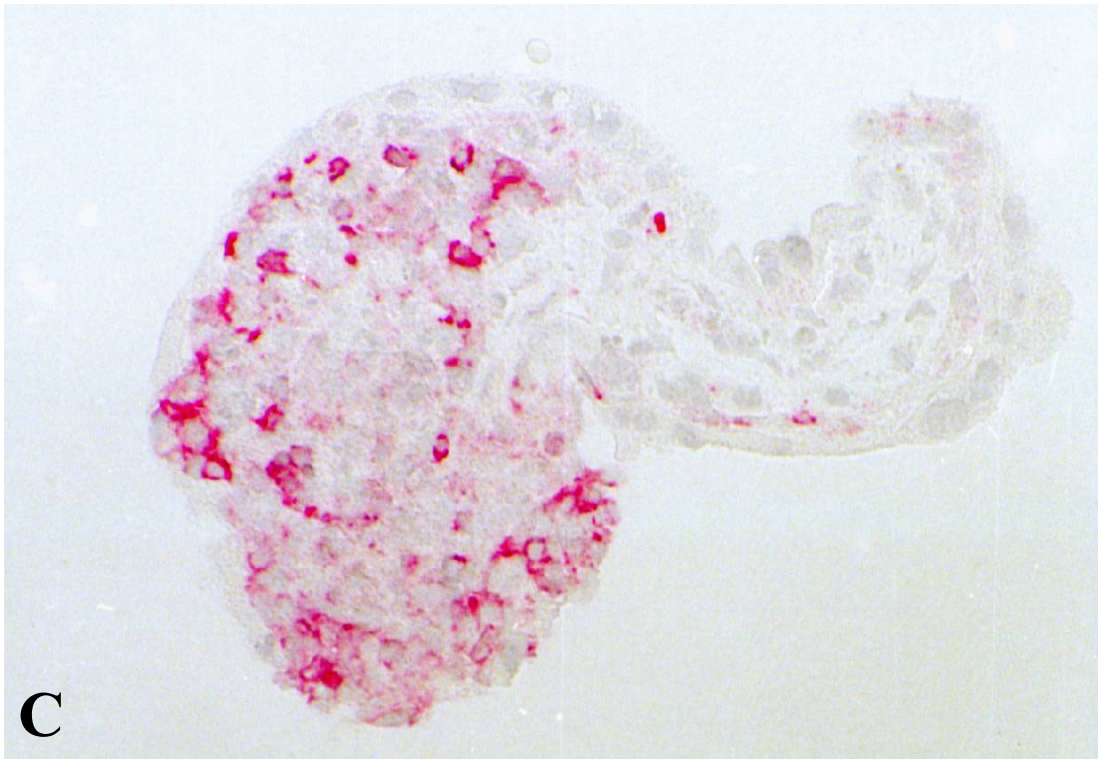
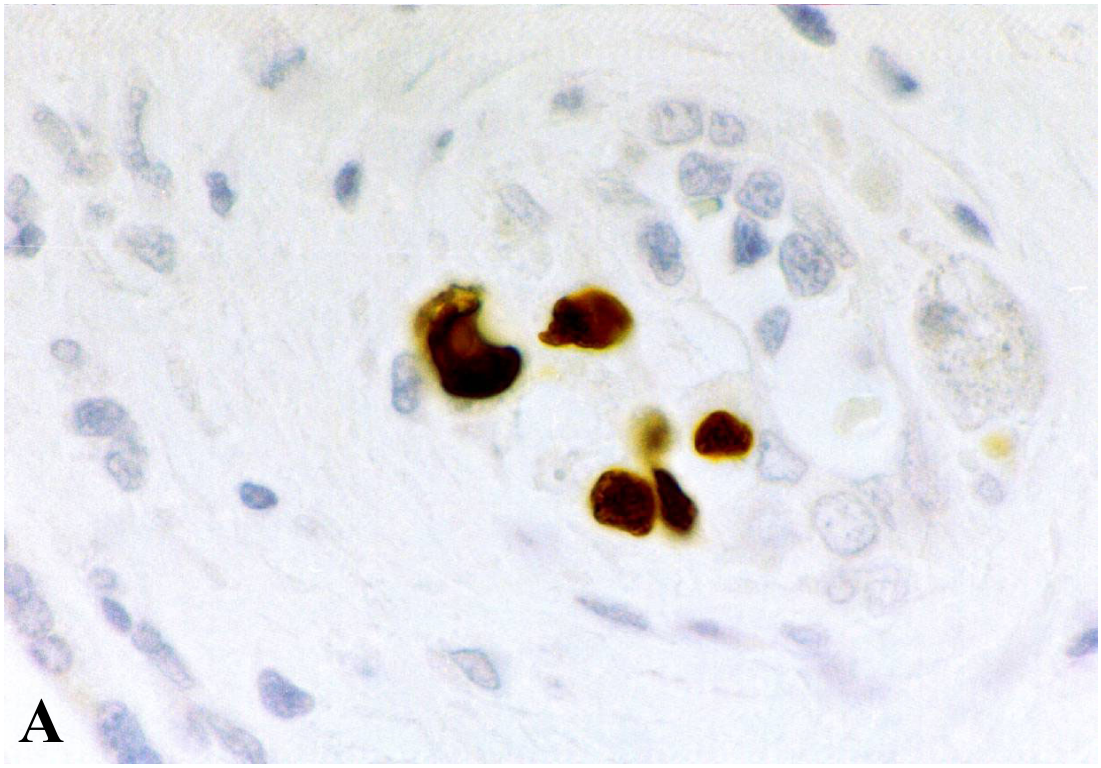
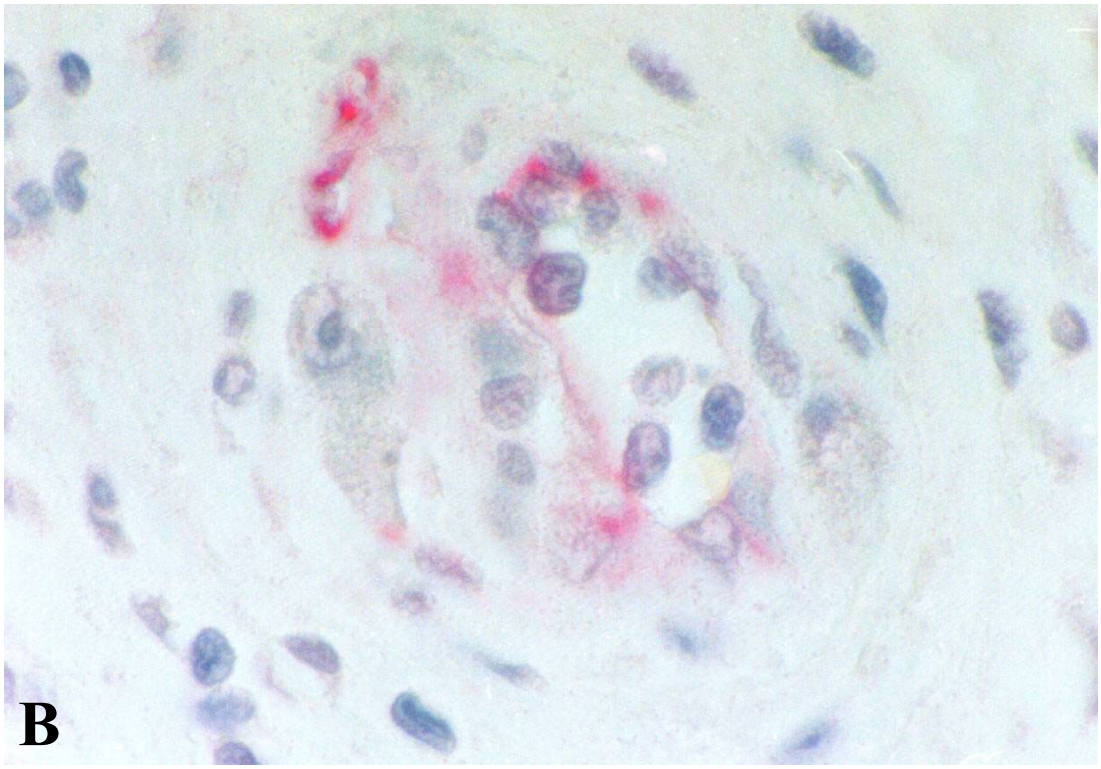


Fig. 7, A-C. Zusammenhang zwischen HCMV-Infektion , ICAM-1 Expression und Leukozytenadhäsion in HCMV-positiver Plazenta. **A-C** zeigen jeweils die gleiche Stelle im Gewebe derselben Plazentazotte in aneinandergrenzenden Serienschnitten.(Dicke 4 μm).Die Gegenfärbung wurde in allen Schnitte mit Hämatoxylin durchgeführt. Vergrößerung in allen Schnitte: 1000x. **A** Das immediate-early-Antigen von HCMV wurde mittels Immun-Peroxidase-Färbung detektiert. (braune Zellkernfärbung). Man sieht eine einzelne Plazentazotte angeschnitten, in der mehrere Zellen HCMV-positiv sind. **B** Es ist in einem angrenzendem Serienschnitt ein Schnitt durch die selbe Zotte wie in A zu sehen. Das ICAM-1 Antigen wurde immunhistochemisch durch Alkalische Phosphatase-Färbung dargestellt (rote zytoplasmatische Färbung). Die HCMV-positiven Zellen weisen selbst keine vermehrte ICAM-1 Expresssion im Vergleich zu ihrer Umgebung auf, jedoch beobachtet man in dieser Zotte ein deutliches ICAM-1 Signal. **C** In einem weiteren angrenzenden Serienschnitt wurde das Leukozyten Antigen (LCA) immunhistochemisch durch Alkalische Phosphatase-Färbung dargestellt (rote zytoplasmatische Färbung). Es ist dieselbe Zotte wie in A und B angeschnitten, in der sich ein starkes Leukozyteninfiltrat.


A


B

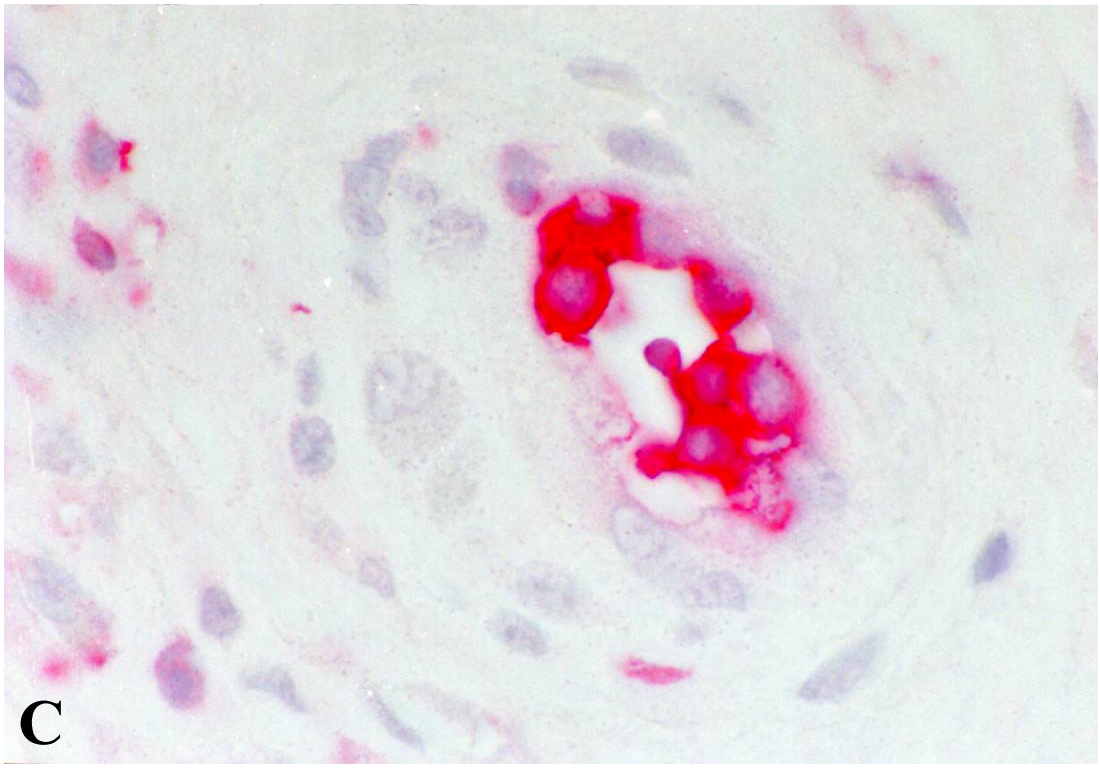


Fig. 8 A-C. Zusammenhang zwischen HCMV-Infektion , ICAM-1 Expression und Leukozytenadhäsion in der Plazenta. Die Antigene wurden in angrenzenden Serienschnitten durch immunhistochemische Einzelfärbung dargestellt. Die Gegenfärbung wurde in allen Schnitte mit Hämatoxylin durchgeführt. **A-C** zeigen jeweils die gleiche Stelle im Gewebe derselben Plazentazotte in hintereinanderliegenden Serienschnitten.(Dicke 4 µm). **A** Das immediate-early-Antigen von HCMV wurde durch Immun-Peroxidase-Färbung dargestellt. HCMV-positive Zellen zeigen eine braune Zellkernfärbung. Es ist ein Blutgefäß mit intravaskulären Zellen zu erkennen. Rechts davon liegen 5 HCMV-positive Stromazellen. **B** Das ICAM-1 Antigen wurde immunhistochemisch durch Alkalische Phosphatase-Färbung detektiert, welche zu einer roten zytoplasmatischen Färbung führt. Links der Mitte ist das Blutgefäß aus Bild I zu erkennen. Die HCMV-positiven Zellen weisen keine erkennbare ICAM-1 Expression auf. Somit unterscheiden sie sich in ihrer ICAM-1 Expression nicht von der ICAM-1 Expression der umliegenden Stromazellen. Auffällig ist jedoch die deutlich intensivere ICAM-1 Färbung der Endothelzellen des angrenzenden Gefäßes**. C** Das Leukozyten Antigen (LCA) wurde immunhistochemisch durch Alkalische Phosphatase-Färbung detektiert, welche zu einer roten zytoplasmatischen Färbung führt. In der Mitte des Bildes liegt das in I und II beschriebene Blutgefäß. An den Wänden des Gefäßes sind deutlich mehrere adhärierende Leukozyten zu erkennen.Vergrößerung in allen Schnitte: 1000x

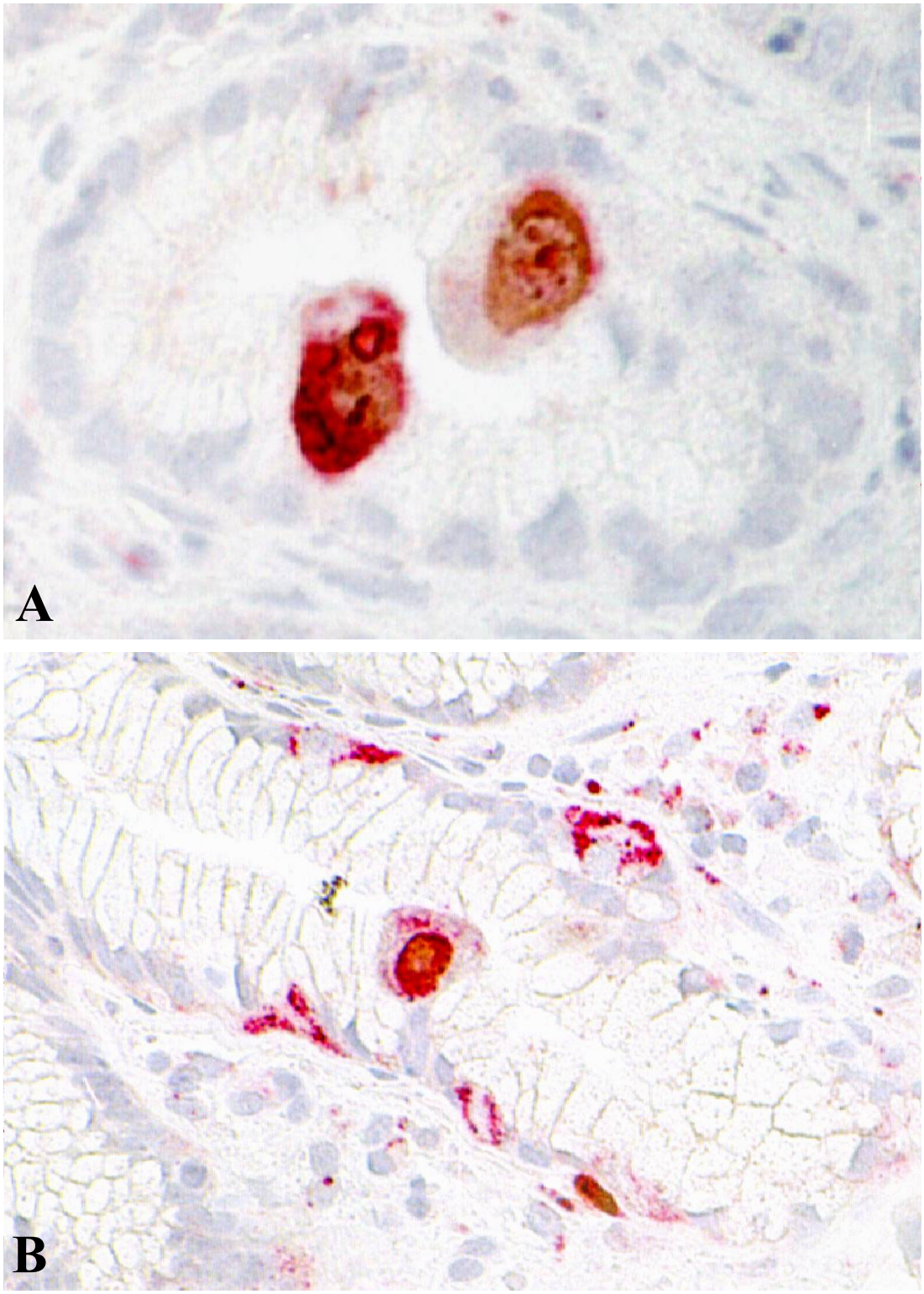
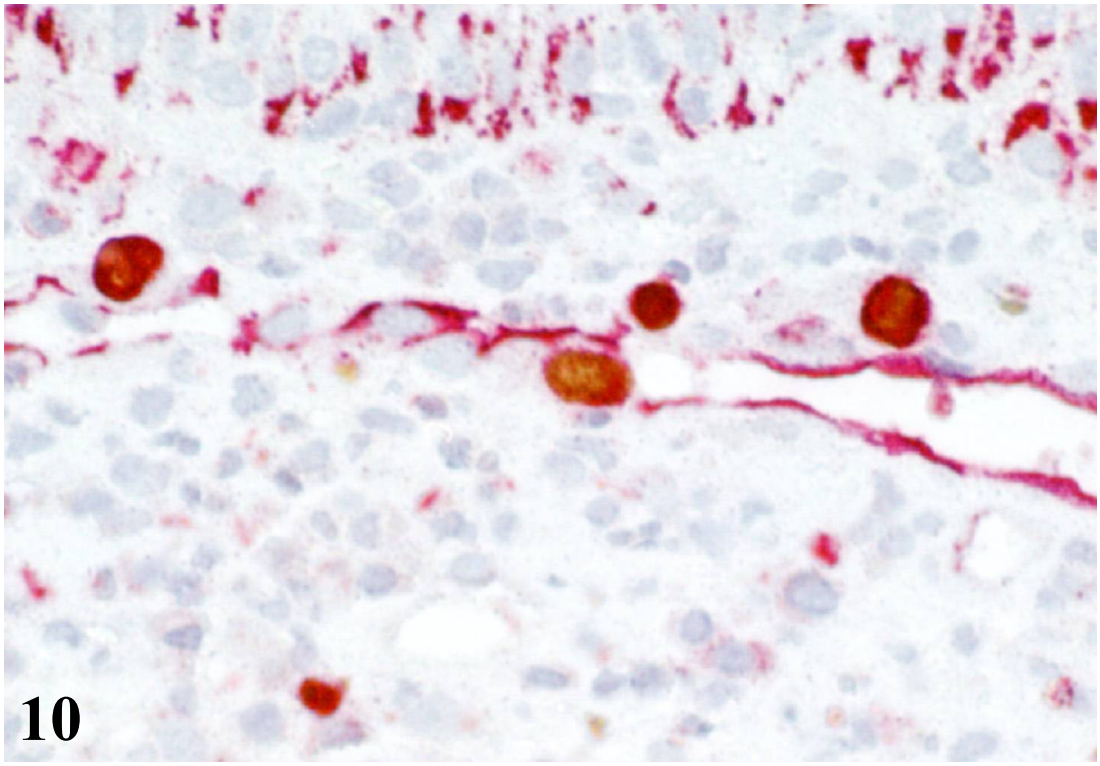


Fig. 9 A, B Darstellung von HCMV-infizierten Zellen und ICAM-1 in Schnitten der Darmschleimhaut. In HCMV-infizierte Zellen wurden das immediate-early-Antigen mit Immunperoxidase angefärbt und weisen eine braune Zellkernfärbung auf. ICAM-1 wurde mit Alkalischer Phosphatase angefärbt und zeigt sich in einer roten zytoplasmatischen Färbung. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. In den Krypten der Darmschleimhaut erkennt man in **A** zwei HCMV-infizierte Zellen, die jedoch wie die Zellen der Umgebung keine ICAM-1 Expression aufweisen. In **B** sieht man eine HCMV-infizierte Zelle, die im Zytoplasma eine ganz milde ICAM-1 zeigt, jedoch gibt es auch nicht infizierte Zellen der Umgebung, die eine ähnliche oder stärkere ICAM-1Färbung aufweisen. Vergrößerung 1000-fach.



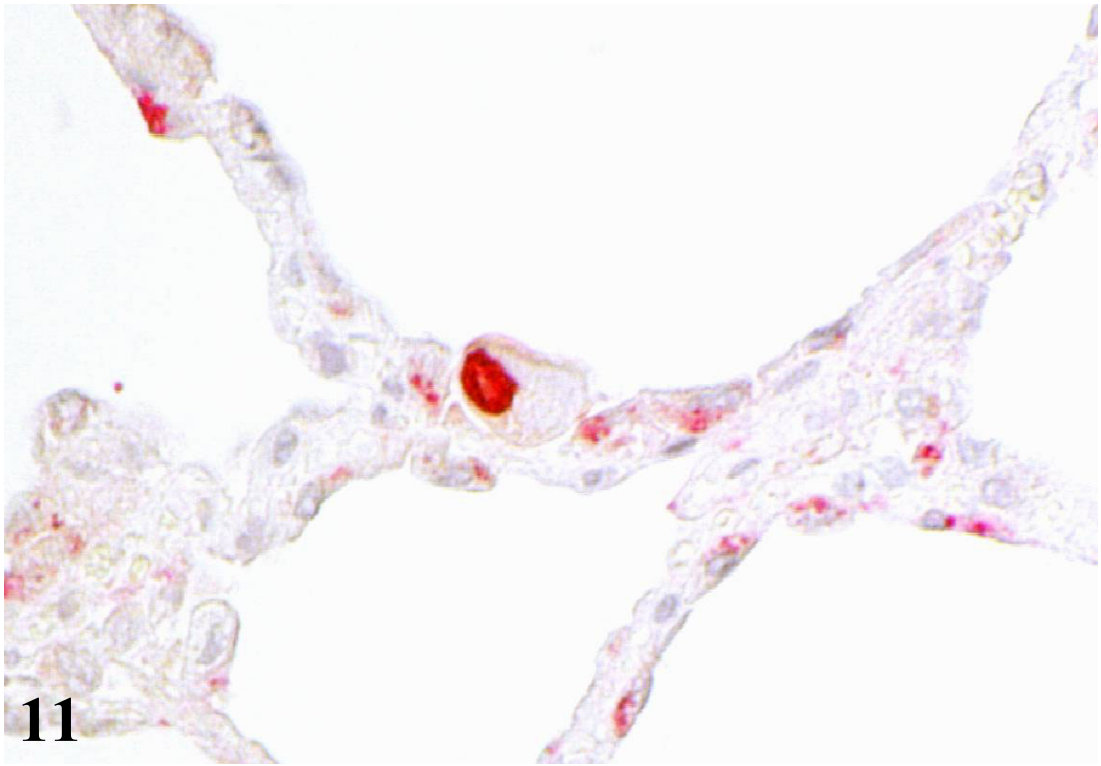


Fig. 10, Fig. 11 Darstellung von HCMV-infizierten Zellen und ICAM-1 Expression in menschlichem Darmgewebe (**10**) und Lungengewebe (**11**). Das immediate-early-Antigen von HCMV wurde mit Immunperoxidase angefärbt, HCMV-infizierte Zellen sind an einem braunen Zellkern zu erkennen. ICAM-1 wurde mit alkalischer Phospahtase angefärbt, was sich in einer roten Färbung im Zytoplasma zeigt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. In **Fig. 10** liegen mehrere HCMV-infizierte Zellen um ein Blutgefäß, die selbst alle keine ICAM-1 Expression aufweisen. Das nicht infizierte Endothel des Blutgefäßes exprimiert jedoch deutlich ICAM-1. In **Fig. 11** ist eine einzelne HCMV-infizierte Zelle in einer Lungenalveole zu sehen. Diese zeigt keine ICAM-1 Expression. In manchen nicht infizierten Zellen der Umgebung erkennt man eine dezente ICAM-1 Expression. Vergrößerung jeweils 1000-fach.

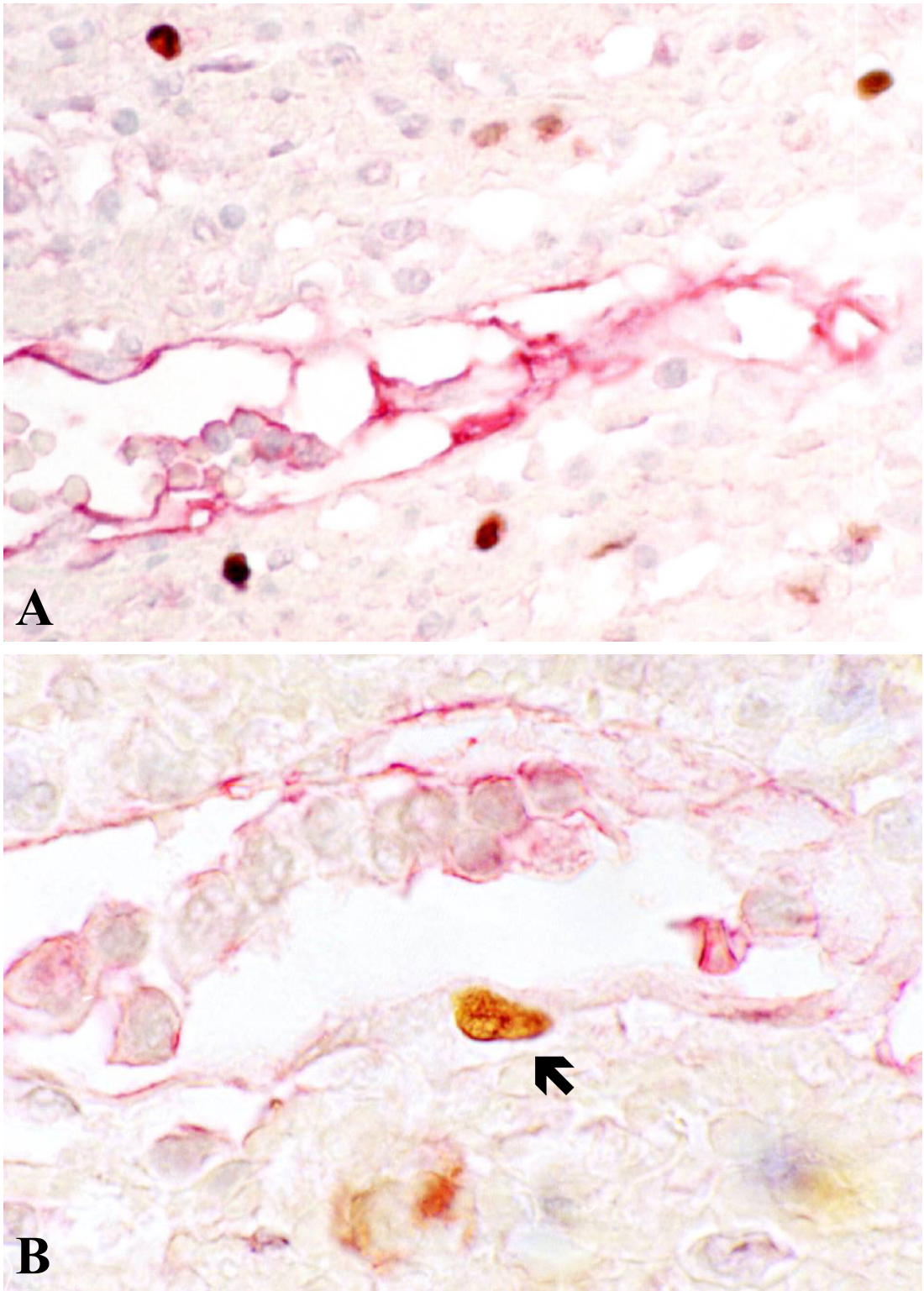


Fig. 12 A, B Zusammenhang zwischen HCMV-Infektion und ICAM-1 Expression in menschlichem Lungengewebe. HCMV-infizierte Zellen wurden über Immunperoxidasefärbung des immediate-early-Antigens dargestellt (braune Zellkerne), ICAM-1 wurde mit alkalischer Phosphatase angefärbt (rotes Zytoplasmasignal). In **A** sind 4 HCMV-infizierte Zellen in der Umgebung eines Blutgefäßes zu sehen. Die infizierten Zellen zeigen selbst keine ICAM-1 Expression, die nicht infizierten Gefäßendothelzellen exprimieren jedoch stark ICAM-1. Einige adhäriernde Leukozyten sind zu erkennen. In **B** sieht man ebenfalls ein Blutgefäß mit einer HCMV-infizierten Endothelzelle (Pfeil). Diese lässt keine ICAM-1 Expression erkennen, wohingegen benachbarte Endothelzellen ICAM-1 exprimieren. Im Gefäßlumen wieder einige adhärierende Leukozyten erkennbar. Vergrößerung jeweils 1000-fach (B mit zoom).

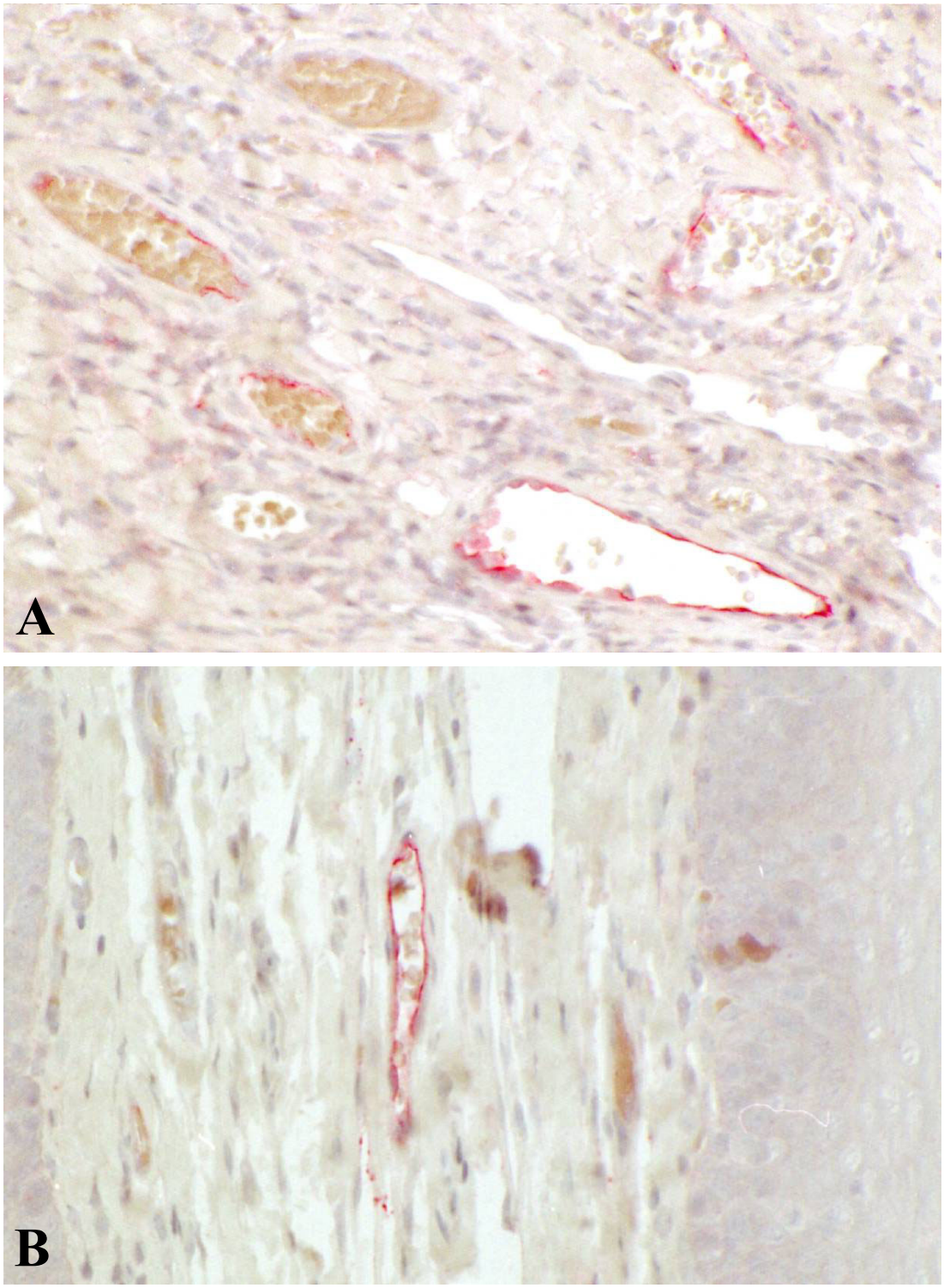


Fig. 13 A, B Beide Bilder zeigen das ICAM-1 Verteilungsmuster in der Tonsille (HCMV-negativ). Das ICAM-1 Antigen wurde immunhistochemisch durch Alkalische Phosphatase-Färbung detektiert, welche zu einer roten zytoplasmatischen Färbung führt. Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Die ICAM-1 Expression betont vor allem das Endothel der Blutgefäße. Daneben sind auch wenige Stromazellen angefärbt. Vergrößerung: jeweils 250x.

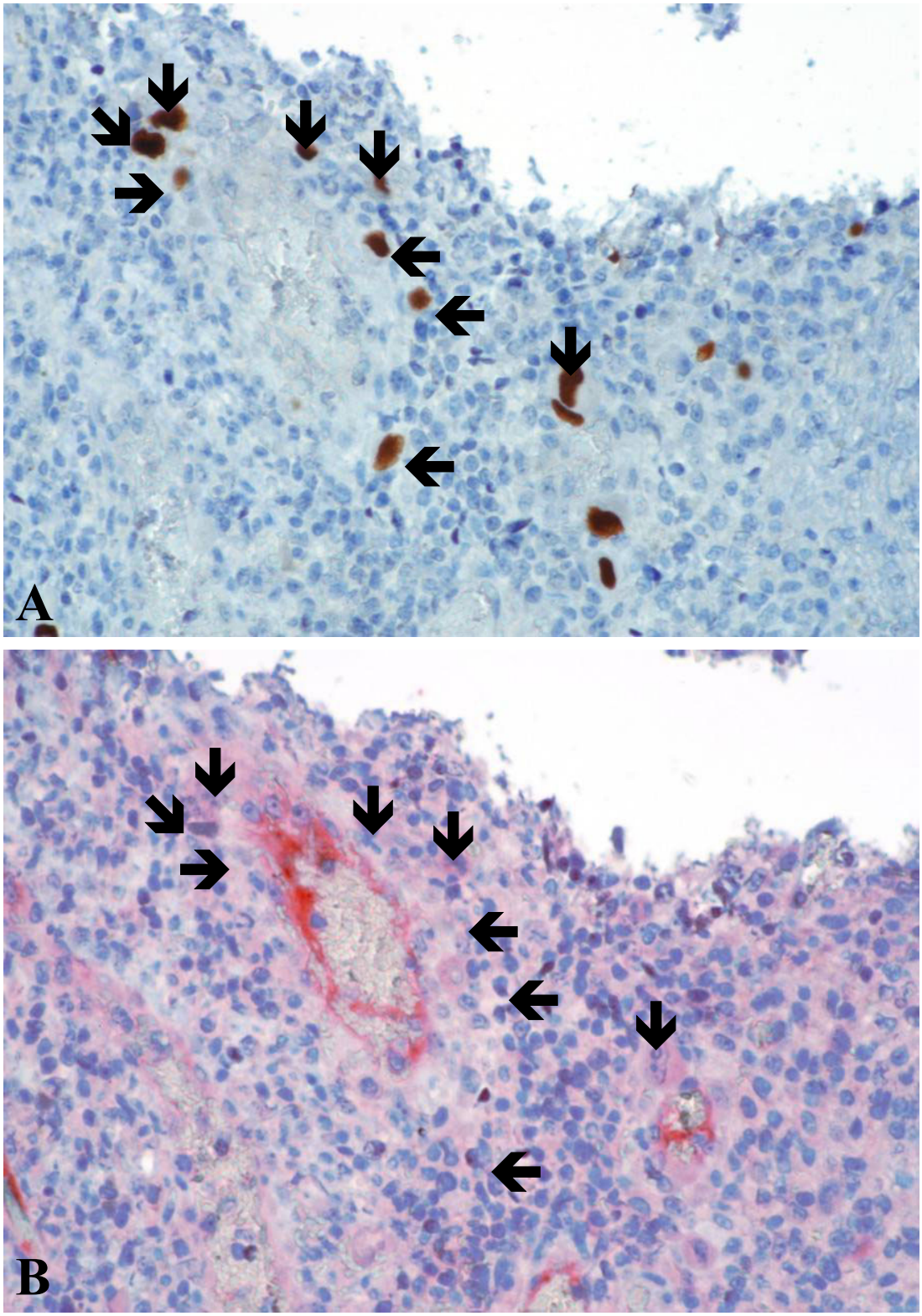


Fig. 14 A, B Zusammenhang zwischen HCMV-Infektion und ELAM-1 Expression in menschlichem Colon-Gewebe. **A** Das immediate-early-Antigen HCMV-infizierter Zellen wurden mit Immunperoxidasefärbung sichtbar gemacht. HCMV-positive Zellen haben einen braunen Zellkern. Man erkennt mehrere HCMV-infizierte Zellen, einige davon sind links oberhalb der Bildmitte um ein Blutgefäß gruppiert(Pfeile zeigen auf die Zellkerne). **B** In einem an A angrenzenden Serienschnitt wurde ELAM-1 durch alkalische Phosphatasefärbung sichtbar gemacht, zu erkennen an einem roten Zytoplasmasignal. Im gleichen Bildausschnitt wie A (die HCMV-infizierten Zellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet), erkennt man, dass die HCMV-positiven Zellen (Pfeile auf die Zellkerne) selbst keine ELAM-1 Expression aufweisen oder eine schwache ELAM-1 Färbung zeigen, die aber im Vergleich

zu nicht infizierten Nachbarzellen nicht hervortritt. Die nicht infizierten Gefäßendothelzellen weisen allerdings eine deutliche ELAM-1 Mehrexpression im Vergleich mit den Nachbarzellen auf. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Vergrößerung 250-fach.

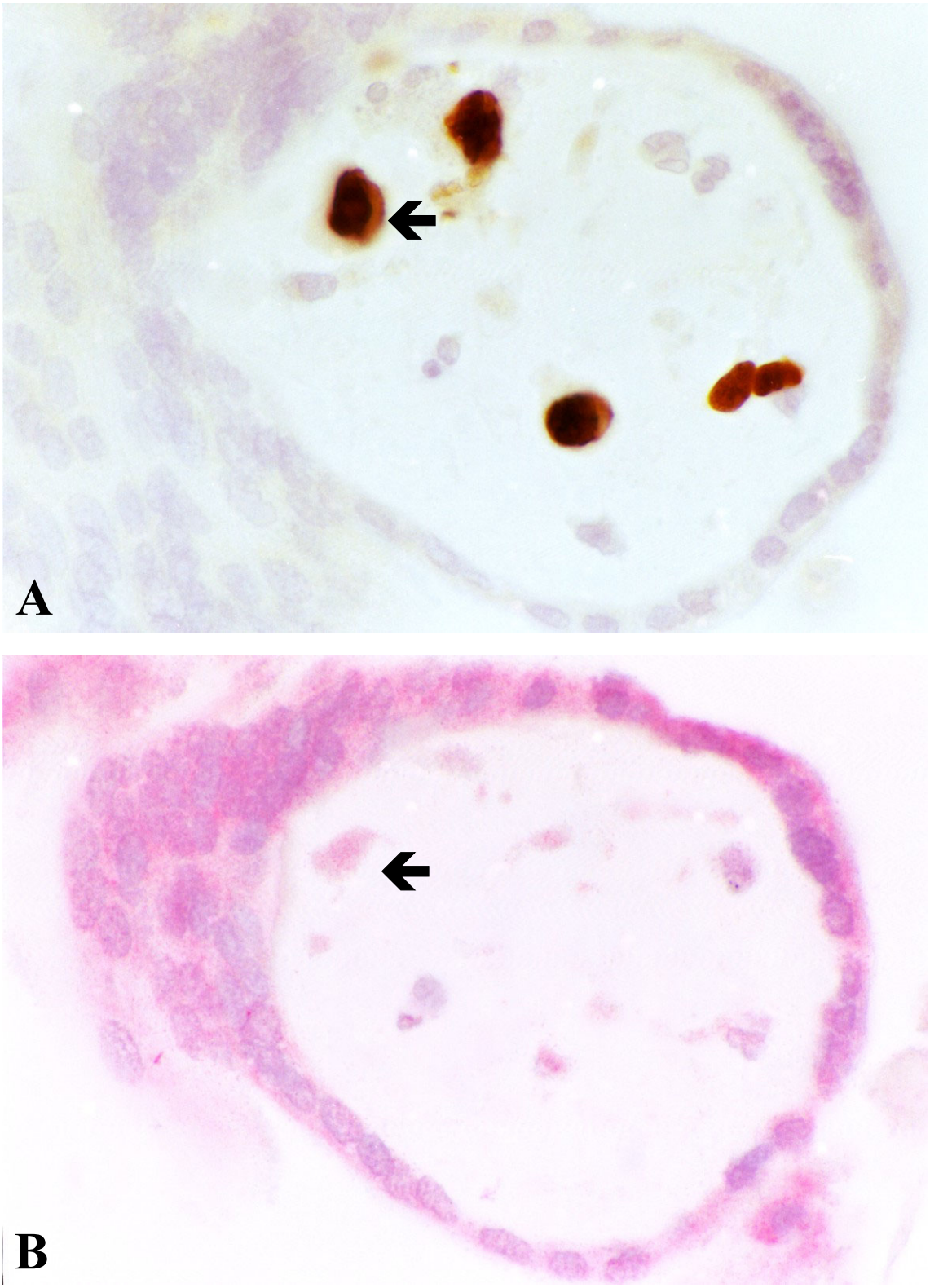


Fig. 15 A, B Zusammenhang zwischen HCMV-Infektion und VCAM-1 Expression in HCMV-infiziertem Plazentagewebe. **A** Darstellung des immediate-early-Antigen von HCMV mit Immunperoxidasefärbung (brauner Zellkern). In diesem Anschnitt einer Plazentazotte sieht man fünf HCMV-positive Zellen im Stroma liegen. **B** Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 wurde mit alkalischer Phosphatase gefärbt (rotes Zytoplasmasignal). Höchstens eine der HCMV-positiven Zellen (Pfeil) besitzt auch eine erkennbare VCAM-1 Expression, die sich jedoch von der VCAM-1 Expression nicht infizierte Zellen in der Umgebung nicht wesentlich abhebt. Die meisten Stromazellen exprimieren jedoch kein VCAM-1. Die Trophoblasten (HCMV-negativ) zeigen jedoch eine deutliche VCAM-1 Expression.

8 Literaturverzeichnis

Adler, S. P. (1988). Cytomegalovirus transmission among children in day care, their mothers and caretakers. *Pediatr Infect Dis J* **7**, 279-85.

Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y. & Fruh, K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 10990-5.

Alford, C. A. & Britt, W. J. (1993). Cytomegalovirus. In *The Human Herpesviruses*. Edited by R. J. Roizman & C. Lopez. New York: Raven Press Ltd.

Allen, M. D., King, C., MacDonald, T. O. & Himes, V. (1996). VCAM-1 and E-selectin expression during cytomegalovirus infection in post-transplant myocardial biopsies. *Clin Transplant* **10**, 528-37.

Arvin, A. M. (1997). Viral infections of the fetus and neonate. In *Viral Pathogenesis*, pp. 801-814. Edited by N. Nathanson. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Augsburger, J. & Henry, R. (1978). Retinal aneurysms in adult cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophtalmol* **86**.

Bienz, K. A. (1993). Herpesviren. In *Medizinische Mikrobiologie*, pp. 347- 354. Edited by N. Y. Georg Thieme Verlag Stuttgart: Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert, Jean Lindenmann.

Bissinger, A. L., Sinzger, C., Kaiserling, E. & Jahn, G. (2002). Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J Med Virol* **67**, 200-6.

Boppana, S., Pass, R., Britt, W., Stagno, S. & Alford, C. (1992). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* **11**, 93-9.

Boppana, S., Rivera, L., Fowler, K., Mach, M. & Britt, W. (2001). Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *New England Journal of Medicine* **344**, 1366-71.

Bowden, R. A. (1995). Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Immunol Invest* **24**, 117-28.

Bowden, R. A., Slichter, S. J., Sayers, M., Weisdorf, D., Cays, M., Schoch, G., Banaji, M., Haake, R., Welk, K., Fisher, L. & et al. (1995). A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood* **86**, 3598-603.

Bowen, J. A. & Hunt, J. S. (1999). Expression of cell adhesion molecules in murine placentas and a placenttal cell line. *Biol- Reprod* **60**, 428-34.

Braun, M., Pietsch, P., Schror, K., Baumann, G. & Felix, S. B. (1999). Cellular adesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc- Res* **41**, 395-401.

Briscoe, D., Yeung, A., Schoen, F., Allred, E., Stavrakis, G., Ganz, P., Cotran, R., Pober, J. & Schoen, E. (1995). Predictive value of inducible endothelial cell adhesion molecule expression for acute rejection of human cardiac allografts. *Transplantation* **59**, 204-11.

Britt, W. J. & Alford, C. A. (1996). Cytomegalovirus. In *Virology*, 3 edn, pp. 2493-2523. Edited by B. N. Fields. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers.

Britt, W. J. & Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* **39**, 401-412.

Browne, E. P., Wing, B., Coleman, D. & Shenk, T. (2001). Altered Cellular mRNA Levels in Huamn Cytomegalovirus-Infected Fibroblasts: Viral Block to the Accumulation of Antiviral m RNAs. *J Virol* **75**, 12319-30.

Chee, M. S., Bankier, A. T., Beck, S. & al., e. (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol* **154**, 125-170.

Craigen, J. L. & Grundy, J. E. (1996). Cytomegalovirus induced up-regulation of LFA-3 (CD58) and ICAM-1 (CD54) is a direct viral effect that is not prevented by ganciclovir or foscarnet treatment. *Transplantation* **62**, 1102-8.

Dahle, A. J., Fowler, K. B., Wright, J. D., Boppana, S. B., Britt, W. J. & Pass, R. F. (2000). Longitudinal investigation of hearing disorders in children with congenital cytomegalovirus. *J Am Acad Audiol* **11**, 283-290.

De Jong, M. D., Galasso, G. J., Gazzard, B., Griffiths, P. D., Jabs, D. A., Kern, E. R. & Spector, S. A. (1998). Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* **39**, 141.

Denton, M. D., Davis, S. F., Baum, M. A., Melter, M., Reinders, M. E. J., Exeni, A., Samsonov, D. V., Fang, J., Ganz, P. & Briscoe, D. M. (2000). the role of the graft endothelium in tranplant rejection: Evidence that endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection. *Pediatr transplantation* **4**, 252-260.

Eggers, M., Bogner, E., Agricola, B. & al., e. (1992). Inhibition of human cytomeglovirus maturation by brefeldin. *J Gen Virol* **73**, 2679-2692.

Einsele, H., Waller, H. D., Weber, P., Frickhofen, N., Dette, S., Horny, H. P., Roos, A., Roos, H., Hebart, H., Schmidt, H. & et al. (1994). Cytomegalovirus in liver biopsies of marrow transplant recipients: detection methods, clinical, histological and immunohistological features. *Med Microbiol Immunol Berl* **183**, 205-16.

Elangbam, C. S., Qualls, C. W., Dahlgren, J. & Dahlgren, R. R. (1997). Cell Adhesion Molecules--Update. *Vet Pathol* **34**, 61-73.

Everett, J. P., Hershberger, R. E., Norman, D. J., Chou, S., Ratkovec, R. M., Cobanoglu, A., Ott, G. Y. & Hosenpud, J. D. (1992). Prolonged cytomegalovirus infection with viremia is associated with development of cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* **11**, 133-7.

Farrell, H. E., Vally, H., Lynch, D. M., Fleming, P., Shellam, G. R., Scalzo, A. A. & Davis-Poynter, N. J. (1997). Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* **386**, 510-4.

Ferran, C., Peuchmaur, M., Desruennes, M., Ghoussoub, J. J., Cabrol, A., Brousse, N., Cabrol, C., Bach, J. F. & Chatenoud, L. (1993). Implications of de novo ELAM-1 and VCAM-1 expression in human cardiac allograft rejection. *Transplantation* **55**, 605-9.

Fishman, J. A. & Rubin, R. H. (1998). Infection in organ- transplant recipients. *N Engl J Med* **338**, 1741.

Foucar, E., Mukai, K., Foucar, K., Sutherland, D. & Van Buren, C. (1981). Colon ulceration in lethal cytomegalovirus infection. *Am J Clin Pathol* **76**, 788-801.

Gilbert, G. L., Hayes, K., Hudson, I. L. & James, J. (1989). Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal Cytomegalovirus Infection Study Group. *Lancet* **1**, 1228-31.

Grattan, M. T., Moreno-Cabral, C. E., Starnes, V. A., Oyer, P. E., Stinson, E. H. & Shumway, N. E. (1989). Cytomegalovirus infection is associated with cardia allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* **261**, 3561-6.

Grefte, A., Harmsen, M. C., van der Giessen, M., Knollema, S., van Son, W. J. & The, T. H. (1994). Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphnuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J Gen Virol* **75**, 1989-98.

Grefte, A., van der Giessen, M., van Son, W. & The, T. H. (1993). Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* **167**, 270-7.

Grefte, J. M., van der Giessen, M., Blom, N., The, T. H. & van Son, W. J. (1995). Circulating cytomegalovirus-infected endothelial cells after renal transplantation: possible clue to pathophysiology? *Transplant Proc* **27**, 939-42.

Grundy, J. E. & Downes, K. L. (1993). Up-regulation of LFA-3 and ICAM-1 on the surface of fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Immunology* **78**, 405-12.

Grundy, J. E., Pahal, G. S. & Akbar, A. N. (1993). Increased adherence of CD2 peripheral blood lymphocytes to cytomegalovirus-infected fibroblasts is blocked by anti-LFA-3 antibody. *Immunology* **78**, 413-20.

Grundy, J. E., Shanley, J. D. & Griffiths, P. D. (1987). Is cytomegalovirus interstitial pneumonitis in transplant recipients an immunopathological condition? *Lancet* **2**, 996-9.

Gulizia, J. M., Kandolf, R., Kendall, T. J., Thieszen, S. L., Wilson, J. E., Radio, S. J., Costanzo, M. R., Winters, G. L., Miller, L. L. & McManus, B. M. (1995). Infrequency of cytomegalovirus genome in coronary arteriopathy of human heart allografts. *Am J Pathol* **147**, 461-75.

Halwachs Baumann, G., Wilders Truschnig, M., Desoye, G., Hahn, T., Kiesel, L., Klingel, K., Rieger, P., Jahn, G. & Sinzger, C. (1998). Human trophoblast cells

are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Virol* **72**, 7598-602.

Hamprecht, K. & Jahn, G. (1994). Zytomegalievirus - Klinik und Therapie. *Ther Umsch* **51**, 551-7.

Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C. & Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* **357 (9255)**, 513-8.

Hengel, H., Brune, W. & Koszinowski, U. H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus- survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends in Microbiology* **6**, 190-7.

Herskowitz, A., Mayne, A. E., Willoughby, S. B., Kanter, K. & A.A., A. (1994). Patterns of myocardila cell adhesion molecule expression in human endomyocardila biopsies after cardiac tranplantation: Induced ICAM- 1 and VCAM- 1 realterd to implantation and rejection. *Am J Pathol* **145**, 1082-94.

Ibrahim, L., Dominguez, M. & Yacoub, M. (1993). Primary human adult lung epithelial cells in vitro: response to interferon-gamma and cytomegalovirus. *Immunology* **79**, 119-24.

Irmiere, A. & Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* **130**, 118-133.

Ito, M., Watanabe, M., Ihara, T., Kamiya, H. & Sakurai, M. (1995). Increased expression of adhesion molecules (CD54, CD29 and CD44) on fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Microbiol Immunol* **39**, 129-33.

Jahn, G., Pohl, W., Plachter, B. & v. Hintzenstein, J. (1988). Kongenitale Cytomegalovirus- Infektion mit letalem Ausgang. *Dtsch Med Wschr* **113**, 424-7.

Jahn, G., Scholl, B. C., Traupe, B. & Fleckenstein, B. (1987). The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol* **68**, 1327-37.

Janeway, C. A. J., Travers, P., Walport, M. & Capra, J. D. (1999). Immunobiology- The Immune System in Health and Disease. Edited by E. S. Ltd. London: Garland Publishing.

Jones, C. A. & Isaacs, D. (1995). Predicting the outcome of symptomatic congenital cytomegalvirus infection. *J Paediatr Child Health* **31**, 70-71.

Jones, T. R., Wiertz, E. J., Sun, L., Fish, K. N., Nelson, J. A. & Ploegh, H. L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11327-33.

Kahl, M., Siegel Axel, D., Stenglein, S., Jahn, G. & Sinzger, C. (2000). Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains. *J Virol* **74**, 7628-35.

Klages, S., Ruger, B. & jahn, G. (1989). Multiplicity dependent expression of the predominant phosphoprotein pp65 of human cytomegalovirus. *Virus Res* **12**, 159-168.

Klein, M., Schoppel, K., Amvrossiadis, N. & Mach, M. (1999). Strain- Specific Neutralization of Human Cytomegalovirus Isolates by Human Sera. *J Virol* **73**, 878-86.

Klemola, E., von Essen, R., Wager, O., Haltia, K., Koivuniemi, A. & Salmi, I. (1969). Cytomeglovirus mononucleosis in previously healthy individuals. *Ann Intern Med* **71**, 11-19.

Koskinen, P. K. (1993). The association of the induction of vascular cell adhesion molecule-1 with cytomegalovirus antigenemia in human heart allografts. *Transplantation* **56**, 1103-8.

Krech, U. (1973). Complement- fixing antybodies against cytomegalovirusin different parts of the world. In *Bull World Health Organ*, pp. 103- 6.

Labarrere, C. A., Nelson, D. R. & Faulk, P. W. (1997). Endothelial activation and development of coronary artery disease in tranplanted human hearts. *JAMA* **278**, 1169-1175.

Lamberson, H. & Dock, N. (1992). Prevention of transfusion- transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion* **32**, 196-8.

Larcher, C., Recheis, H., Sgonc, R., Gottinger, W., Huemer, H. P. & Irschick, E. U. (1997). Influence of viral infection on expression of cell surface antigens in human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **235**, 709-16.

Lautenschlager, I., Hockerstedt, K., Taskinen, E. & von Willebrand, E. (1996). Expression of adhesion molecules and their ligands in liver allografts during cytomegalovirus (CMV) infection and acute rejection. *Transpl Int* **9 Suppl 1**, S213-5.

Lee, S. J. & Benveniste, E. N. (1999). Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *J Neuroimmunol* **98**, 77-88.

Loebe, M., Schuler, S., Zais, O., Warnecke, H., Fleck, E. & Hetzer, R. (1990). Role of cytomegalovirus infection in the development of coronary artery disease in the transplanted heart. *J Heart Transplant* **9**, 707-11.

Mazeron, M. C., Ferchal, F. & Perol, Y. (1993). Rapid detection of human cytomegalovirus viraemia from small volumes of heparinized whole blood. *Res Virol* **144**, 169-71.

McDonald, K., Rector, T. S., Braulin, E. A., Kubo, S. H. & Olivari, M. T. (1989). Association of coronary artery disease in cardiac tranplant recipients with cytomegalovirus infection. *Am J Cardiol* **64**, 359-62.

Michelson, F. S., Horodniceanu, F. & Guillon, J. C. (1977). Immediate ealry antigens in human cytomegalovirus infected cells. *Nature* **270**, 615-617.

Mocarski, E. (1993). Cytomegalovirus Biology and Replication. In *The Human Herpesviruses*. Edited by R. J. W. Roizman & C. Lopez. New York: Raven Press Ltd.

Mocarski, E. S. J. & Courcelle, C. T. (2001). Cytomegaloviruses and their replication. In *Fields´ virology*, 4 edn, pp. 2629-2674. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Modrow, S. & Falke, D. (1997). Molekulare Virologie. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum, Akadem. Verlag.

Nadasdy, T., Smith, J., Laszik, Z., Waner, J. L., Johnson, L. D. & Silva, F. G. (1994). Absence of association between cytomegalovirus infection and obliterative transplant arteriopathy in renal allograft rejection. *Mod Pathol* **7**, 289-94.

Park, S. Y., Kim, H. W., Moon, K. C., Hong, H. K. & Lee, H. S. (2000). mRNA expression of intercellular adhesion molecule- 1 and vascular cell adhesion molecule- 1 in acute renal allograft rejection. *Transplantation* **69**, 2554-60.

Pass, R. F. (1985). Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis* **152**, 243-8.

Pass, R. F. (2001). Cytomegalovirus. In *Fields´ virology*, 4 edn, pp. 2675-2706. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Paya, C., Hermans, P., Wiesner, R., Ludwig, J., Smith, T., Rakela, J. & Krom, R. (1989). Cytomegalovirus hepatitis in liver transplantation: Prospective analysis of93 consecutive orthotopic liver transplantations. *J Infect Dis* **160**, 752-8.

Podlech, J., Holtappels, R., Pahl Seibert, M. F., Steffens, H. P. & Reddehase, M. J. (2000). Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J Virol* **74**, 7496-507.

Postigo, A. A., Teixido, J. & Sanchez-Madrid, F. (1993). The alpha 4 beta 1/ VCAM- 1 adhesion pathwy in physiology and disease. *Res Immunol* **144**, 723- 735.

Ramsey, P. G., Rubin, R. H., Tolkoff- Rubin, N. E., Cosimi, A. B., Russell, P. S. & Greene, R. (1980). The renal transplant patient with fever and pulmonary infiltrates: Etiology, clinical manifestations and managment. *Medicine* **59**, 206-222.

Reyburn, H. T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., DAvis, D. M., Pazmany, L. & Strominger, J. L. (1997). The class I MhC homhologue of human cytomegalovirus inhibits attacks by natural killer cells. *Nature* **386**, 514-7.

Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G. & Sinzger, C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **81 Pt 2**, 393-9.

Rubin, R. H. (1990). Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev Infect Dis* **12 Suppl 7**, S754-66.

Scholz, M., Cinatl, J., Gross, V., Vogel, J. U., Blaheta, R. A., Freisleben, H. J., Markus, B. H. & Doerr, H. W. (1996). Impact of oxidative stress on human

cytomegalovirus replication and on cytokine-mediated stimulation of endothelial cells. *Transplantation* **61**, 1763-70.

Sedmak, D. D., Knight, D. A., Vook, N. C. & Waldman, J. W. (1994). Divergent patterns of ELAM-1, ICAM-1, and VCAM-1 expression on cytomegalovirus-infected endothelial cells. *Transplantation* **58**, 1379-85.

Shahgasempour, S., Woodroffe, S. B. & Garnett, H. M. (1997). Alterations in the expression of ELAM- 1, ICAM- 1 and VCAM- 1 after in vitro infection of endothelial cells with a clinical isolate of human cytomegalovirus. *Microbiol Immunol* **41**, 121-9.

Sinzger, C., Bissinger, A. L., Viebahn, R., Oettle, H., Radke, C., Schmidt, C. A. & Jahn, G. (1999). Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and In vivo. *J Infect Dis* **180**, 976-86.

Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., The, T. H. & Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* **76**, 741-50.

Sinzger, C. & Jahn, G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* **39**, 302-19.

Sinzger, C., Plachter, B., Grefte, A., The, T. H. & Jahn, G. (1996). Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis* **173**, 240-5.

Spaete, R. R., R.C., G. & M.P., L. (1994). Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol* **75**, 3287-3308.

Span, A. H., Mullers, W., Miltenburg, A. M. & Bruggeman, C. A. (1991). Cytomegalovirus induced PMN adherence in relation to an ELAM-1 antigen present on infected endothelial cell monolayers. *Immunology* **72**, 355-60.

Spear, G. T., lurain, N. S., Parker, C. J., Ghassemi, M., Payne, G. H. & Saifuddin, M. (1995). Host cell-derived complementcontrol proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. HTLV-I and HCMV. *J Immunol* **155**, 4376-81.

Spector, D. H. (1996). Activatioin and regulation of human cytomegalovirus early geens. *Intervirology* **39**, 361-377.

Spiller, O. B., Hanna, S. M., Devine, D. V. & Tufaro, F. (1997). Neutralization of cytomegalovirus virirons: the role of complement. *J Infect Dis* **176**, 339-47.

Spiller, O. B., Morgan, B. P., Tufaro, F. & Devine, D. V. (1996). Altered expression of host-encoded complement regulators on human cytomegalovirus- infected cells. *Eur J Immunol* **26**, 1532-8.

Stenberg, R. M. (1996). The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* **39**, 343-349.

Stolpe, A. v. d. & Saag, P. T. v. d. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* **74**, 13-33.

Stovin, P. G., Wreghitt, T. G., English, T. A. & Wallwork, J. (1989). Lack of association between cytomegalovirus infection of heart and rejection-like inflammation. *J Clin Pathol* **42**, 81-3.

Stuart, P. M., Usui, N., Randhawa, R. S., Laycock, K. A., Fleming, T. P. & Pepose, J. S. (1997). Differential effects of HSV- 1 and HCMV infection on adhesion molecule expression on human corneal keratocytes. *Curr Eye Res* **16**, 496-502.

Tanio, J. W., Basu, C. B., Albelda, S. M. & Eisen, H. J. (1994). Differntial expression of the cell adhesion molecules ICAM- 1 and VCAM- 1m and E-selectin in normal and posttranplantation myocardium. Cell adhesion molecule expression in human cardiac allografts. *Circulation* **89**, 1760-8.

Tong, C. Y., Bakran, A., Peiris, J. S., Muir, P. & Simon Herrington, C. (2002). The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfuncion after renal transplantation. *Transplantation* **74**, 576-8.

Valantine, H. A. (1999). Role of CMV in trnaplant coronary artery disease and survival after heart transplantation. *Tranpl Infect Dis* **1**, 25-30.

van Dorp, W. T., van Wieringen, P. A., Marselis Jonges, E., Bruggeman, C. A., Daha, M. R., van Es, L. A. & van der Woude, F. (1993). Cytomegalovirus directly enhances MHC class I and intercellular adhesion molecule-1 expression on cultured proximal tubular epithelial cells. *Transplantation* **55**, 1367-71.

von Willebrand, E., Pettersson, E., Ahonen, J. & Hayry, P. (1986). CMV infection, class II antigen expression, and human kidney allograft rejection. *Transplantation* **42**, 364-7.

Waldman, W. J. (1998). Cytomegalovirus as a perturbing factor in Graft/Host equilibrium: Havoc at the endothelial interface. In *CMV- Related Immunopathology*, pp. 54-66. Edited by M. Scholz, D. H. W. Rabenau & J. J. Cinatl. Basel: Karger.

Waldman, W. J., Knight, D. A. & Huang, E. H. (1998). An in vitro model of T cell activation by autologous cytomegalovirus (CMV)-infected human adult endothelial cells: contribution of CMV-enhanced endothelial ICAM-1. *J Immunol* **160**, 3143-51.

Wang, J.-h. & Springer, T. A. (1998). Structural specializiations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunological Reviews* **163**, 197-215.

Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H. J. & Ploegh, H. L. (1996a). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC I heavy chains from the endoplasmatic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**, 769-79.

Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. & Ploegh, H. L. (1996b). Sec61-mediated transfer of membrane protein from the endoplasmatic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-8.

Wright, H. T. J., Goodheart, C. R. & Lielausis, A. (1964). Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virology* **23**, 419-424.

Zanghellini, F., Boppana, S. B., Emery, V. C., Griffiths, P. D. & Pass, R. F. (1999). Asymptomatic Primary Cytomegalovirus Infection: Virologic and Immunologic Features. *J Infect Dis* **180**, 702-07.

Zhang, X. P., Kelemen, S. E. & Eisen, H. J. (2000). Quantitative assessment of cell adhesion molecule gene expression in endomyocardial biopsy specimen from cardiac transplant recipients using competitive polymerase chain reaction. *Transplantation* **70**, 505-13.

Zhu, H., Shen, Y. & Shenk, T. (1995). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* **69**, 7960-70.

Zygmunt, M., Wienhard, J., Boving, B., Munstedt, K., Braems, G., Bohle, R. M. & Lang, U. (1998). [Expression of cell adhesion molecules in the extravillous trophoblast in placenta of preterm pregnancies and in placentas at term.]. *Zentralbl- Gynäkol* **120**, 488-92.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Jahn ich für die Möglichkeit an der Medizinischen Virologie in Tübingen diese Arbeit erstellen zu können und die Erlaubnis, die Einrichtungen des Institutes zu nutzen.

Herrn PD Dr. med. Christian Sinzger danke ich für die Überlassung des Themas, für die hervorragende fachliche Betreuung, die außerordentlich fundierte Einführung in wissenschaftliches Denken und Arbeiten und die angenehme und motivierende Offenheit für Diskussionen über das Thema.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Sinzger danke ich für die exzellente Zusammenarbeit.

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mich in jeder Phase vielfach unterstützten danke ich besonders.

Vielen Dank Ingo Ammermann für die stets geduldige Betreuung von Computerproblemen und die motivierende Unterstützung.

Lebenslauf

Ariane Kerstin Stefanie Klein

geboren am 12.03.1975 in Reutlingen

Mühlstr. 20

72074 Tübingen

Tel.: 0 70 71 / 2 15 11

E-Mail: ariane.klein@web.de

1981-1985	Grundschule Winkelwiese in Tübingen.
1985-1994	Gymnasium der Geschwister- Scholl- Schule in Tübingen;
1994	Abitur an der Geschwister-Scholl-Schule
Ab Oktober 1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard- Karls-Universität in Tübingen.
September 1996	Ärztliche Vorprüfung.
März 1997	Famulatur in der Allgemeinchirurgie am Kreiskrankenhaus Böblingen.
August 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Sommer 1998	Famulatur am Hadassah Hospital in Jerusalem in Neonatologie und Geburtshilfe.
Januar-Juli 1999	Austauschstudium der Humanmedizin an der Brown University, Providence, RI in den USA für sechs Monate.
März 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Seit Mai 2000	Doktorarbeit am Institut für Medizinische Virologie in Tübingen.
Oktober 2000-September 2001	Praktisches Jahr:
November 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Seit April 2002	Ärztin im Praktikum an der Kinderklinik in Tübingen.