

Universität Ulm
Institut für Mikrobiologie und Immunologie
Abteilung Virologie
Leiter: Prof. Dr. Th. Mertens

Modulation der Apoptose nach Infektion mit humanem Zytomegalievirus (HCMV)

Dissertation

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

vorgelegt von

Sven Alexander Mörk
aus Leonberg

Ulm 2003

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. R. Marre
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Mertens
2. Berichterstatter: PD Dr. med. S. Fulda

Tag der Promotion: 24.06.2004

Meinen Eltern
Dafür, was ich bin
und dafür, was ich sein darf!

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Einführung	1
1.2 Apoptose	2
1.2.1 Morphologische Veränderungen bei Apoptose	3
1.2.2 Todesrezeptoren	5
1.2.3 Apoptose-Signalkaskade von CD95 (APO-1, Fas)	6
1.2.4 Apoptosehemmung	7
1.3 Die Herpesviren	8
1.3.1 Aufbau und Struktur der Herpesviren	8
1.3.2 Pathogenese und Epidemiologie der HCMV-Infektionen	9
1.3.3 Krankheitsbilder bei Immunsuprimierten	10
1.4 Ziele der Arbeit	11
2 MATERIAL	12
2.1 Geräte	12
2.2 Analysegeräte	12
2.3 Analysesoftware	12
2.4 Viren	13
2.5 Zellen	13
2.6 Zellstimulantien, Apoptoseinduktoren	13
2.7 Monoklonale Antikörper	13
2.8 Weitere Verbrauchsmaterialien	14
2.9 Kulturmedien, Puffer und Lösungen	14
2.9.1 Zellkultur	14
2.9.2 FACS-Messungen	15
2.9.3 Annexin-Färbung	16
2.9.4 Sonstige Puffer und Lösungen	16
3 METHODEN	17
3.1 Zellkultivierung und Einfrieren von Zellen	17
3.1.1 Kultivierung humaner Vorhautfibroblasten (HFF, human foreskin fibroblasts)	17
3.1.2 Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen (SMC, smooth muscle cells)	18
3.1.3 Kultivierung von humanen Umbilicalvenenendothelzellen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells)	18
3.1.4 Einfrieren von Zellen	19

3.2	Viruskultivierung, Austitration und Infektion	19
3.2.1	Infektion	19
3.2.2	Virusstock-Herstellung	20
3.2.3	Titerbestimmung der HCMV- Isolate	20
3.3	Durchflußzytometrie	21
3.3.1	Methodische Grundlagen	21
3.3.2	Durchführung der Zellpräparation zur Analyse von Oberflächenantigenen	24
3.3.3	Auswertung für Oberflächenantigenbestimmung	25
3.3.4	Durchführung für Apoptosemessung	26
3.3.4.1	Annexin-FITC-Staining	26
3.3.4.2	Nicoletti-Färbung	26
3.3.4.3	Messung morphologischer Veränderungen	27
3.3.4.4	Messung der DNA - Fragmentierung	27
3.4	Statistik „Wilcoxon-Test“	28
4	ERGEBNISSE	29
4.1	Analyse der Apoptoserezeptoren CD95, TNF-R1 und TNF-R2	29
4.2	Analyse der Apoptosesensitivität nach Infektion mit HCMV Varianten	34
4.3	Übersicht über Expression von Apoptoserezeptoren und Sensitivität für Apoptoseinduktion auf HFF, SMC, AEC, HCAEC, HUVEC	39
5	DISKUSSION	41
6	ZUSAMMENFASSUNG	45
7	LITERATURVERZEICHNIS	47
	DANKSAGUNGEN	54
	LEBENS LAUF	55

Abkürzungsverzeichnis

AD169	Zytomegalievirusstamm
AEC	Artery endothelial cells
ALPS	Autoimmun – lymphoproliferatives – Syndrom
AMD	Actinomycin D
BBE	Bovine Brain Extrakt
BG	Background
BSA	Bovine Serum Albumine
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CD	Cluster of Differentiation
CHX	Cycloheximid
CID	Cytomegalic Inclusion Disease
CMV	Zytomegalievirus
CPE	Zytopathischer Effekt
DISC	Death inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Early
EBM	Endothelial Cell Basal Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Analysing Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	fötales Kälberserum
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein-isothiocyanat In Durchflußzytometrie verwendeter Farbstoff (grün)
FLIP	Fluorescence inhibiting protein
FSC	Forward scatter
FSN	Fluorescence – signal to Noise
gld	generalized lymphoproliferative disease
HCAEC	Humane Coronar artery endothelial cell
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
hEGF	human recombinant Epidermal Growth Factor
HEPES	2-Hydroxyethyl-piperazine-2-ethansulfonicacid

HFF	Human Foreskin Fibroblasts
hFGF	human recombinant Fibroblast Growth Factor
HLA	Human leukocyte antigen
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IAP-1	Inhibitor der Apoptose
IAP-2	Inhibitor der Apoptose
IE	intermediate-early
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
L	late
MEM	Minimum Essentiel Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	Multiplikator of Infection
mRNA	messenger RNA
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
NGF	Nerve growth factor
NK-Zellen	Natural Killer Zellen
p.i.	post infectionem
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PE	In Durchflußzytometrie verwendeter Farbstoff (rot)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SMC	smooth muscle cells
SSC	Sidewards scatter
TB40E	Zytomegalievirusstamm
TB40F	Zytomegalievirusstamm
TNF	Tumornekrosefaktor
Toledo	Zytomegalievirusstamm
Towne	Zytomegalievirusstamm
TRAIL	Tumornecrosisfactor related Apoptosis inducing Ligand
WinMDI	Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry
XIAP	Inhibitor der Apoptose

1 Einleitung

1.1 Einführung

Zwischen Viren und ihren Wirtsorganismen besteht ein dynamisches Gleichgewicht, das durch Virusreplikation und antivirale Immunantwort des Wirtsorganismus bestimmt wird. Vor allem Viren mit langer Replikationszeit und Latenzbildung haben Mechanismen entwickelt, um in der Wirtszelle zu verbleiben ohne von der Immunantwort des Wirtsorganismus erkannt und eliminiert zu werden. Das Immunsystem dagegen ist bestrebt, Virusreplikation zu unterdrücken und nach Möglichkeit virusinfizierte Zellen vollständig zu eliminieren.

Viren sind obligat intrazelluläre Erreger und sind auf die parasitäre Nutzung eines intakten Zellstoffwechsels für ihre Vermehrung und Verbreitung angewiesen. Dadurch ist es in ihrem Interesse, das Überleben der infizierten Wirtszelle für die Zeit der Virusreplikation zu gewährleisten. Für die antivirale Immunität ist die spezifische zytotoxische Immunantwort von zentraler Bedeutung.

Besonders bei den Viren der Herpesgruppe sind aufgrund langer Replikationszeiten und der lebenslangen Persistenz Strategien der Immunevasion wichtig. Verschiedenste Mechanismen der Immunevasion wurden in der Literatur bereits für Viren, u.a. auch für Herpesviren beschrieben. HCMV kodiert beispielweise Oberflächenrezeptoren, die als „falsche“ Andockstellen die Funktion von NK – Zellen inhibieren („decoy Rezeptoren“) [16, 51, 66]. Der Expression von viral kodierten Fc–Rezeptoren in infizierten Zellen wird eine Schutzfunktion vor dem Angriff durch Antikörper zugeschrieben. Die verminderte Expression von Todesrezeptoren als ein Weg zur Inhibition von Apoptose wird diskutiert [36]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Infektion mit HCMV (humanes Zytomegalievirus) auf die rezeptorvermittelte Apoptose untersucht.

Dabei wurde zum einen der Einfluss auf die veränderte Expression der Apoptose vermittelnden Oberflächenrezeptoren CD95, TNF–Rezeptor 1 und TNF–Rezeptor 2 untersucht, zum anderen der Einfluss der HCMV-Infektion auf die Apoptosesensitivität der infizierten Zellen erforscht.

1.2 Apoptose

Synonyme: programmierter Zelltod, aktivierungsinduzierter Zelltod

Apoptose ist dem Griechischen entlehnt und beschreibt das Herabfallen der Blätter von den Bäumen. Galenus Galen beschrieb im zweiten Jahrhundert nach Christus erstmals die Regression von larvalen und fetalen Strukturen während der Ontogenese. Diese Beobachtung wurde aber erst 1842 von Carl Vogt wieder aufgenommen, der beschrieb, dass Zellen während der Ontogenese durch „programmierten Zelltod“ sterben können. [69] Im Jahr 1952 beschrieb der Embryologe Glucksmann die Umwandlung embryonalen Gewebes, die er auf den selektiven Untergang einzelner Zellen zurückführte. [5, 11, 18] Erst Kerr, Wyllie und Currie prägten den Begriff der Apoptose für ihre Beobachtungen an toxinbehandelten Leberzellen, die bei ihrem Tod eine ähnliche Morphologie zeigten wie untergehende Embryonalzellen. [30]

Im Gegensatz zur Nekrose, bei der es immer zu einer begleitenden Entzündungsreaktion des Gewebes kommt, findet diese bei der Apoptose im Sinne eines physiologischen Zelluntergangs nicht statt.

Die physiologische Bedeutung der Apoptose bei der Embryo- und Organogenese besteht in der Gestaltung und in der Homöostase von Geweben. Sie ist unter anderem für die Beseitigung von alten, verletzten, mutierten und auch von virusinfizierten Zellen im Organismus wichtig. Dazu kommen immunologische Funktionen, z.B. bei der Selektion potenziell autoreaktiver Immunzellen bei der T-Zellreifung im Thymus. [17, 27, 42] Auf dem Gipfel einer Immunreaktion wird ein Überschießen der Immunantwort durch Apoptose verhindert. [45] Diesen Vorgang bezeichnet man als aktivierungsinduzierten Zelltod (Activation Induced Cell Death). [12, 14, 48]

Apoptose ist auch an der Elimination virusinfizierter und maligne entarteter Zellen durch zytotoxische T-Zellen beteiligt. Nach Präsentation viraler Antigene über MHC-I-Proteine und Erkennung durch spezifische zytotoxische T-Zellen werden virusinfizierte Zellen u.a. durch Aktivierung der CD95-vermittelten Apoptose-Signalkaskade eliminiert. [52]

Im Maussystem sind mehrere Mutanten im CD95 Apoptose-System bekannt. Sie unterstreichen die Bedeutung für das Immunsystem. Bei der lpr-Mutation

(Lymphproliferation) ist durch die Insertion eines Transposons in das zweite Intron des CD95-Gens die Expression von CD95 unterdrückt. [1, 10, 70] Bei der lpr^{cg} wird die Signaltransduktion durch einen Aminosäureaustausch in der Todesdomäne verhindert. [38] Bei der gld -Mutation (generalized Lymphproliferative Disease) ist dagegen der CD95 – Ligand betroffen. Ein Aminosäureaustausch im Bereich von CD95L verhindert dessen Bindung. [60] Auch beim Menschen sind diese Mutationen beschrieben worden. Sie führen wie bei den Mäusen zur Ausbildung eines Autoimmun-lymphoproliferativen Syndroms (ALPS).

1.2.1 Morphologische Veränderungen bei Apoptose

Apoptose ist durch eine charakteristische Abfolge morphologischer Veränderungen gekennzeichnet (Abb.1), die teilweise in unseren Experimenten zum Nachweis apoptotischer Zellen benutzt wurden. Apoptose führt zum Schrumpfen der Zelle und zur Kondensation des Chromatins, Veränderungen der Zellmembran führen zu charakteristischen Ausstülpungen (Zeiose). Parallel dazu wird eine Veränderung der Membransymmetrie (Blebbing) beobachtet, was zur Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche führt. Diese Veränderungen sind charakteristisch für frühe Schritte der Apoptose. An den Mitochondrien kommt es zu einer Veränderung des Membranpotentials der mitochondrialen Zellmembran, was Ausdruck des beginnenden Funktionsverlustes ist. Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien aktiviert nachgeschaltete Effektorsysteme der Apoptose (Aposom Formation, Caspase 9-Aktivierung).

Als späte Zeichen der Apoptose werden irreversible Vorgänge bezeichnet, bei denen die DNA durch spezifische Endonukleasen zwischen den Nukleosomen gespalten wird („point of no return“). Dies führt zu charakteristischen DNA-Fragmenten mit einer Länge von 200 Basenpaaren oder ganzzahligen Vielfachen davon. Schließlich werden membranumschlossene Säckchen abgeschnürt (Blebbing), die dann als apoptotische Körperchen bezeichnet werden.

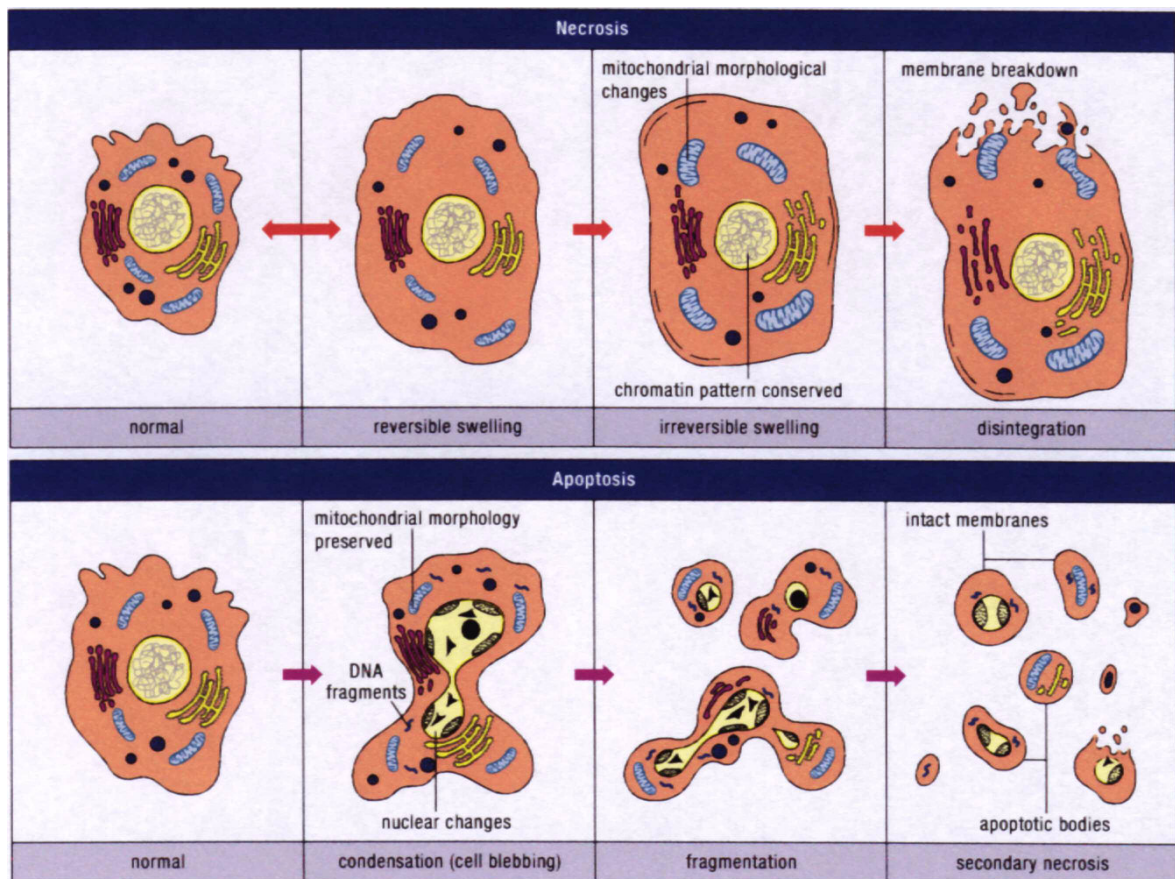


Abbildung 1: Nekrose vs. Apoptose (aus „Apoptosis Slide Show – Understanding Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation“ Roche Diagnostics)

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose durch das Anschwellen der Zelle (Oncose, hydropische Schwellung) charakterisiert. Dies führt zu einer sehr frühen Zerstörung der Zellmembran und damit zur Freisetzung von Zellinhalt in den interzellulären Raum. Dadurch wird eine lokale Entzündungsreaktion in Gang gesetzt, durch die eine zusätzliche Gewebsschädigung erfolgen kann. Diese lokale Entzündungsreaktion ist charakteristisch für Nekrosen, wird aber nicht bei Apoptose gesehen. Die unterschiedlichen zellulären Veränderungen bei Apoptose und Nekrose sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

1.2.2 Todesrezeptoren

Im Jahr 1982 wurde mit CD95 (Apo-1, fas) ein Oberflächenrezeptor beschrieben, durch dessen Aktivierung Apoptose induziert werden kann [25, 44]. CD95 gehört zur Familie der TNF-/NGF-Rezeptoren [2, 55]. Charakteristisch für den molekularen Aufbau dieser Rezeptorenfamilie sind zwei bis acht cystinreiche Domänen. CD95 ist ein differenziell glykolysiertes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 42 bis 52 kDa, das auf den meisten Säugetierzellen exprimiert wird [33].

Innerhalb der TNF-/NGF-Rezeptorfamilie bilden die sogenannten Todesrezeptoren eine Subfamilie. Apoptose-Rezeptoren mit Todesdomäne (DeathDomain (DD)) sind in der Lage, apoptoseinduzierende Liganden zu binden und über die DD die intrazelluläre Apoptose-Signalkaskade zu stimulieren. Die Sensitivität der Apoptose-Signalkaskade ist abhängig von Zelltyp und Zelldifferenzierung [50].

Tabelle 1: Beispiele für Apoptose-Rezeptoren und apoptoseinduzierende Liganden

Rezeptor	Ligand
CD95	CD95L
TRAIL-R1 – R4	TRAIL (APO-2L)
TNF-R I, TNF-R II	TNF- α

Unter physiologischen Bedingungen können die Todesrezeptoren durch Interaktion mit spezifischen, zellulär gebundenen oder löslichen Liganden aktiviert werden, in vitro ist jedoch auch die Aktivierung durch agonistische, stimulierende Antikörper möglich. Auch die Liganden der Apoptoserezeptoren bilden eine Familie, die sogenannte TNF-Familie. CD95L, ein glykolysiertes Transmembranprotein mit einer Molekularmasse von 40 kDa, ist der Ligand für CD95. [59, 61] Im Gegensatz zu CD95 ist die Expression von CD95L auf aktivierte T-, B- und NK-Zellen, sowie auf Zellen einiger nicht lymphoider Organe wie

Hoden und die vordere Augenkammer beschränkt [19]. Aber auch die Expression auf verschiedenen neoplastischen Zellen konnte gezeigt werden [21, 43, 58].

Die lösliche Form des normalerweise membranständigen Liganden entsteht durch die Einwirkung von Metalloproteasen, die CD95L oberhalb der Zellmembran spalten. [29, 37, 62]

1.2.3 Apoptose-Signalkaskade von CD95 (APO-1, Fas)

CD95-vermittelte Signalwege sind besonders gut untersucht und sollen beispielhaft beschrieben werden.

Nach Bindung des Liganden (CD95-L) an den Rezeptor (CD95) kommt es zu einer Trimerisierung und Aktivierung von CD95 [4]. CD95 – Dimere sind im Gegensatz zu Multimeren nicht in der Lage, Apoptose auszulösen. [13]

Die Multimerisierung der Apoptoserezeptoren führt zu räumlicher Nähe der intrazellulären Rezeptoranteile und zur Bildung eines Signalkomplexes (Death Inducing Signalling Complex, DISC) (Abb. 2). Dieser Komplex entsteht durch Interaktion der Todesdomänen von trimerisiertem CD95, Adaptermolekülen (FADD/MORT1) und Procaspase 8 und induziert dessen proteolytische Spaltung in aktive Caspase 8. Dies ist die erste Caspase (Initiator-Caspase) einer Caspase-Signalkaskade, die als klassischer Apoptoseweg beschrieben wird („common pathway“). Caspasen sind Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum und der Spezifität nach einem Aspartam zu spalten: **Cystein–Aspartasen**. Nach Aktivierung der Caspase–8 werden untergeordnete Caspasen und schließlich Effektor-Caspasen aktiviert (z.B. Caspase-3), die dann die zellulären Substrate spalten und zum Zelltod führen. Die Caspasen spalten zelluläre Proteine, wie z. B. Actin, d.h. Proteine des Zellgerüsts. Ein weiterer irreversibler Schritt der Apoptose ist der Verdau zellulärer DNA durch zelluläre Endonukleasen (z.B. Caspase-aktivierten-DNase / CAD) [6, 8]. Die Spaltung der DNA findet zwischen den DNA–Schutzproteinen, den Nukleosomen, statt. Da Nukleosomen in charakteristischen Abständen auf dem DNA-Strang aufsitzen, stellt sich die zerschnittene DNA auf einem Elektrophorese-Gel in charakteristischer Weise, als „DNA–Leiter“ dar [9, 15, 34, 35, 53].

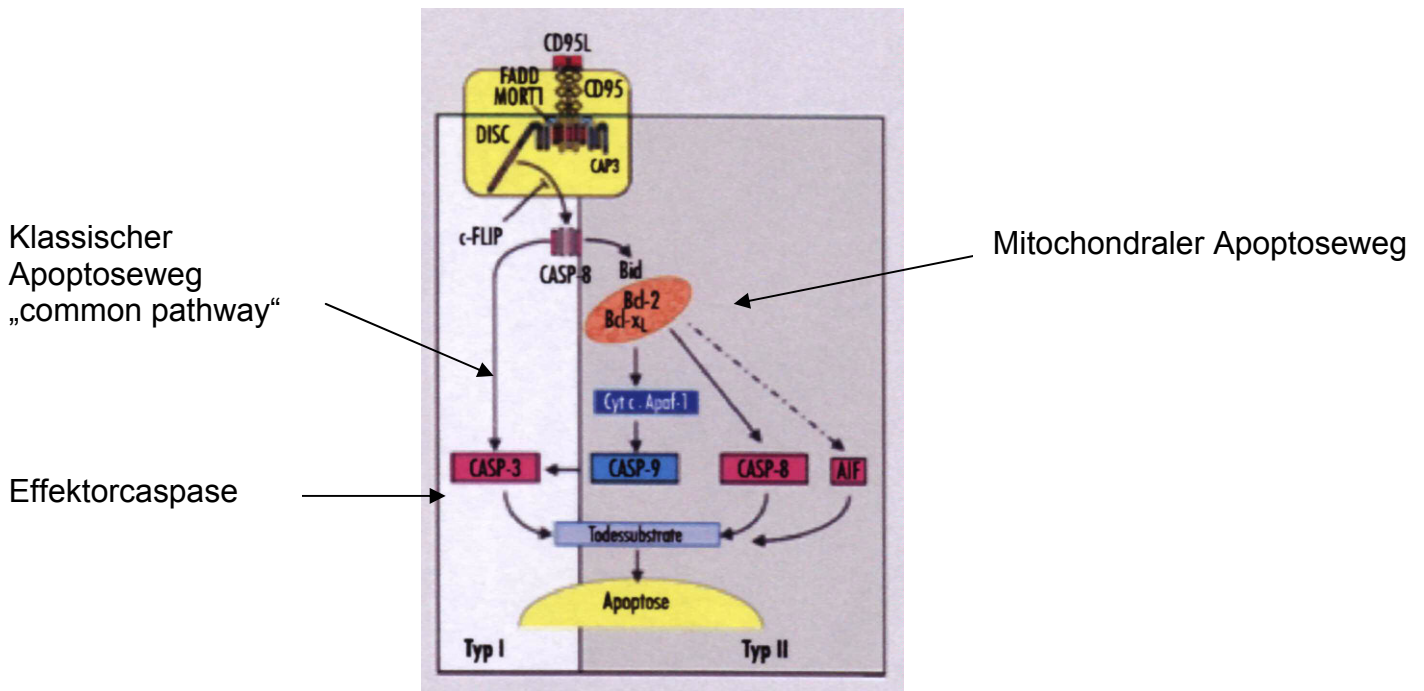


Abbildung 2: Apoptose-Signalkaskade (aus „Dt Ärzteblatt 2000;97:A-1752-1759“)

1.2.4 Apoptosehemmung

Sicherungen und Regulationsmöglichkeiten der Apoptoseaktivität durch zelluläre und virale Proteine sind auf allen Ebenen der Apoptose – Signalkaskade bekannt. Eine Hemmung der Apoptose durch zelluläre Proteine am Anfang der Signalkaskade erfolgt z.B. durch FLIP (Flice inhibiting protein), bei späteren Schritten durch Inhibitoren der Apoptose (IAPs), z.B. durch XIAP, IAP-1, IAP-2 oder auf der Ebene der Mitochondrien (Bcl-2-Familie). Einige transformierende Viren sind in der Lage, virale FLIPs zu produzieren [64], die die Caspase-8 Aktivierung verhindern.

Eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation spielen die Proteine der Bcl-2-Familie. Ursprünglich wurden sie nach den Onkogenen bcl-2 benannt, die als Folge einer Translokation in follikulären B-Lymphozyten überexprimiert werden. [65] Bcl-2 stimuliert nicht wie andere Onkogene die Proliferation, sondern inhibiert die Apoptose von Zellen. [23, 69] Bcl-2 besitzt eine Transmembrandomäne am C-Terminus, die zu einer Insertion in die äußere Mitochondrienmembran führt und damit das Membranpotential stabilisiert. [26, 32] Wird diese Domäne deletiert, dann verliert bcl-2 seine antiapoptotische Wirkung. [63]

1.3 Die Herpesviren

Die Einteilung der humanen Herpesviren erfolgt nach biologischen Eigenschaften wie Replikationsdauer, Zelltropismus, Latenzort und transformierenden Eigenschaften. Als Gemeinsamkeit aller Herpesviren können strenge Wirtstropismus, Latenz und Reaktivierung genannt werden. Nach diesen Kriterien ergibt sich die Einteilung in drei Subfamilien, die sogenannten α -, β - und γ -Herpesviridae.

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) ist als β -Herpesvirus durch hohe Speziesspezifität, fehlende Transformation und einen langen Replikationszyklus (72 Stunden) gekennzeichnet. Ein spezifischer Ort der Latenz von HCMV ist nicht bekannt. In vivo können jedoch fast alle Organe z.B. Haut, Milz, Speicheldrüse, Knochenmark, Gehirn, Plazenta, intestinale Schleimhäute, Alveolar- und Bronchialepithel der Lunge, Pankreas und Nieren infiziert werden [3, 39]

1.3.1 Aufbau und Struktur der Herpesviren

Die Herpesviren sind ikosaedrische, umhüllte, doppelsträngige DNA-Viren mit einer Größe von 180 – 350 nm. Die Hülle besteht aus einer Lipid-Doppelmembran mit eingelagerten viralen Glykoproteinen. Das Tegmentum wird aus einer Matrix aus globulären viralen Proteinen gebildet. Mit Core wird die genomassoziierte, fibrilläre Proteinmatrix benannt.

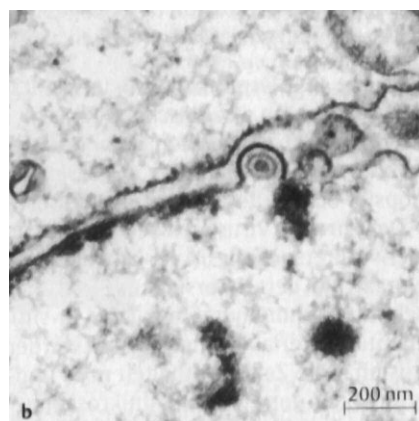


Abbildung 3:

Herpesvirus (CMV) mit Hülle

Herpesvirus im Kern der Wirtszelle;
Hüllenbildung an der Kernmembran

Die Genexpression des Herpesvirus lässt sich in drei Phasen der Proteinsynthese unterteilen: immediate-early (IE), early (E) und late (L). Die IE Produktion beginnt unmittelbar nach der Infektion unabhängig von der Expression anderer CMV-Genprodukte und führt zur Transaktivierung von E-Genprodukten. IE- und E-Proteine werden zur Induktion später CMV-Genprodukte (L-Proteine) benötigt. In der late-Phase werden strukturelle Komponenten der Virionen synthetisiert. In ihr findet auch die DNA-Replikation statt. Die unterschiedlichen Phasen der HCMV-Replikation können durch metabolische Inhibitoren in vitro untersucht werden (Fensterversuch mit Cycloheximid (CHX) und Actinomycin D (AMD)).

Replikation von HCMV

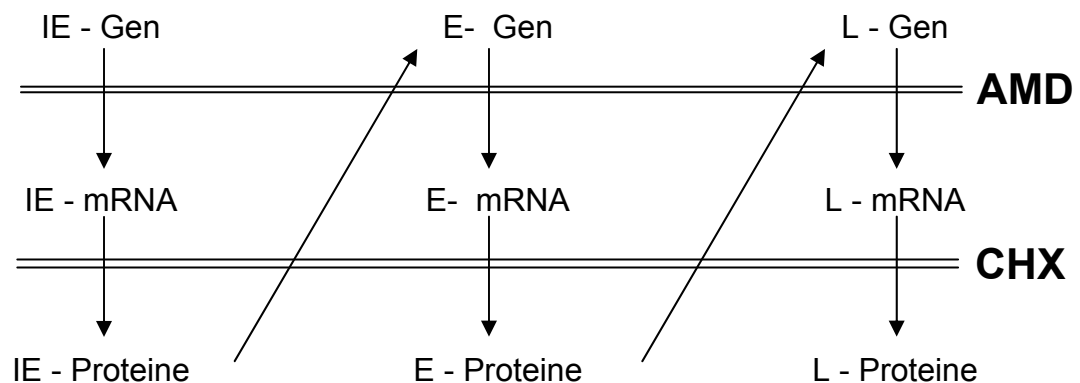


Abbildung 4: Zeitliche Expression von HCMV-mRNA und CMV-Proteinen während der Replikation

1.3.2 Pathogenese und Epidemiologie der HCMV-Infektionen

Eine Primärinfektion beim Gesunden verläuft in aller Regel asymptomatisch. Im Rahmen der Primärinfektion können sich aber auch mononukleoseartige Krankheitsbilder, Hepatitis sowie fieberhafte, grippeartige Erkrankungen zeigen. Zu schweren Erkrankungen kommt es allerdings gehäuft bei nicht voll Immunkompetenten wie z.B. Frühgeborenen, HIV-Infizierten im Stadium AIDS, Transplantatempfängern oder Tumorkranken nach Knochenmarktransplantation. Hier kann es auch durch Reaktivierung zu schwersten generalisierten Infektionen mit letalem Ausgang kommen. Eine besondere Gruppe von Risikopatienten sind

Feten nach Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft. Eine Assoziation von CMV-Infektion bei Organtransplantierten mit der Transplantatabstoßung wird ebenfalls diskutiert.

HCMV wird ausschließlich von Mensch zu Mensch übertragen. Die Übertragung erfolgt bei engem Kontakt durch Speichel, Schmierinfektion, Intimverkehr, iatrogen durch Bluttransfusion oder Organtransplantation, aber auch über die Muttermilch und transplazentar. Während in den Industriestaaten die Prävalenz beim Erwachsenen 60-80 % beträgt, liegt sie in den Entwicklungsländern nahezu bei 100 %. [20, 47, 54]. Dabei spielen die sozioökonomischen Unterschiede in der Hygiene der Länder eine große Rolle.

Trotz des gemeinsamen Serotyps gibt es eine große Anzahl verschiedener HCMV-Stämme. Dabei wird zwischen Patientenisolaten (Wildstämmen) und Laborstämmen (z.B. AD169, Towne, Toledo) unterschieden.

1.3.3 Krankheitsbilder bei Immunsuprimierten

Bei Erstinfektion einer Schwangeren kommt es in bis zu 50% der Infektionen zur intrauterinen Infektion. Zehn Prozent der intrauterin infizierten Kinder erkranken schwer mit Zeichen der Hepatosplenomegalie, Hepatitis, Panzytopenie und Mikrozephalie (cytomegalic inclusion disease, CID). Die Mortalität beträgt zehn Prozent. In der Folge treten bei zehn Prozent der Infizierten neurologische Spätschäden auf, die sich z.B. in mentaler Retardierung, Schwerhörigkeit, Sehstörungen und psychomotorischen Entwicklungsstörungen äußern [46, 57]. Die neurologischen Störungen sind im Gegensatz zu den Organmanifestationen in der Regel nicht reversibel. Schwere postnatale CMV-Infektionen von Frühgeborenen können auch postnatal durch Übertragung mit Muttermilch erfolgen. Bei der endogenen HCMV-Reaktivierung während der Schwangerschaft kommt es in der Regel nicht zur fetalen Infektion.

Die Art und Schwere der CMV - Erkrankung bei Transplantierten ist unter anderem von der Art der Transplantation und vom Ausmaß der Immunsuppression abhängig. Bekannte CMV-Erkrankungen und Symptome bei Transplantierten sind: Hepatitis, Colitis, Leukozytopenie, Thrombozytopenie und Fieber. Die gefürchtetste Komplikation der CMV-Infektion bei Knochenmarktransplantierten ist die CMV – Pneumonie.

Die CMV-Erkrankung bei HIV-Infizierten kann sich als Enzephalitis, Hepatitis, Gastroenteritis und Chorioretinitis manifestieren und betrifft fast ausschließlich Patienten mit dem Vollbild AIDS. [28]

1.4 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Modulation apoptosevermittelnder Oberflächenrezeptoren CD95, TNF-Rezeptor 1 und TNF-Rezeptor 2 durch verschiedene HCMV-Stämme untersucht werden. Die Apoptosemodulation sollte in unterschiedlichen Zellsystemen untersucht und verglichen werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwieweit die veränderte Expression von Apoptose-Rezeptoren auch die Empfindlichkeit HCMV-infizierter Zellen für Apoptosesignale beeinflusst. Zusammenfassend sollte die Bedeutung der Apoptose-Modulation als Immunevasionsstrategie nach HCMV-Infektion geprüft werden.

2 Material

2.1 Geräte

Beckman JS-21 Zentrifuge	Beckman, Palo Alto, USA
Biofuge	Heraeus, Hanau
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Eppendorf Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Christ Kühlzentrifuge	Heraeus, Hanau
Fluovert FS Invertmikroskop	Leitz, Wetzlar
Zählmikroskop	Leitz, Wetzlar
Invertmikroskop	Nikon, Tokio, Japan
Sterile Bänke	Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Heraeus, Hanau
Vortex	Bachofer, Reutlingen

2.2 Analysegeräte

Durchflusszytometer FACScan	Becton & Dickinson
Confokales Lasermikroskop	Zeiss

2.3 Analysesoftware

CellQuest V2.8 for MacOS	BD, Bioscience
WinMDI 2.8 for Windows 95	Joseph Trotter, The Scripps Research Institute
Prism	GraphPad

2.4 Viren

AD 169 (Laborstamm)

TB40E (Endothelzell – adaptiert)

freundlicherweise von Dr. C. Sinzger
(Tübingen) zur Verfügung gestellt

TB40F (Fibroblasten – adaptiert)

Towne (Laborstamm)

Toledo (Laborstamm)

Delta pp65

Pachter

2.5 Zellen

HFF (Human Foreskin Fibroblasts)

Humane Vorhautfibroblasten (p10-14)

SMC (Smooth Muscle Cells)

glatte Muskelzellen (p4-6)

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

2.6 Zellstimulantien, Apoptoseinduktoren

rekombinanter Tumornekrosefaktor α (TNF - α) PAN

Tumornecrosisfactor related apoptosis inducing receptor (TRAIL)

Tebu (Heidelberg)

Anti – CD95 IgG3

Hybridom Überstand

(Dr. Gudrun Strauss,
Universitätskinderklinik Ulm)

2.7 Monoklonale Antikörper

anti - CD95 IgG3

Hybridom Überstand

(Dr. Gudrun Strauss,
Universitätskinderklinik Ulm)

anti – TNF Rezeptor I

Dianova (p75, mouse IgG1)

anti – TNF Rezeptor II

Dianova (p75, mouse IgG1)

anti – HLA Klasse I

DAKO

Annexin-V (FITC)

Alexis

2.8 Weitere Verbrauchsmaterialien

Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco, NY, USA
FCS (fötales Kälberserum)	Gibco, NY, USA
FACS-Röhrchen	Falcon
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millipore und Nalgene
Zellkultur Plastikwaren	Greiner, Nürtingen
	NUNC, Wiesbaden

2.9 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

2.9.1 Zellkultur

Zellkulturmedium für humane Vorhautfibroblasten (HFF):

MEM	Minimum Essential Medium	Gibco
2 mM	L-Glutamin	Seromed
100 IU/ml	Penicillin	Seromed
0.1 mg/ml	Streptomycinsulfat	Seromed
1%	nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)	Seromed
10%	FBS (1 Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert)	Gibco

Zellkulturmedium für glatte Muskelzellen (SMC):

SmBM	Smooth Muscle Cell Basal Medium
0.5 µg/ml	human recombinant Epidermal Growth Factor (hEGF)
1 µg/ml	human recombinant Fibroblast Growth Factor (hFGF)
50 mg/ml	Gentamycin, 50 µg/ml Amphotericin B (GA 1000)
5mg/ml	Insulin
10%	FBS Fetal Bovine Serum

Zellkulturmedium für humane Umbilicalvenenendothelzellen (HUVEC)

EBM	Endothelial Cell Basal Medium	Clonetics
10µg/ml	human recombinant Epidermal Growth Factor (hEGF)	
1mg/ml	Hydrocortisone (HC)	
3 mg/ml	Bovine Brain Extrakt (BBE)	
50 mg/ml	Gentamycin, 50 µg/ml Amphotericin B (GA 1000)	
10%	FBS	

Kryomedium für Zellen:

50%	Minimum Essential Medium
20%	FBS
10%	DMSO

Kryomedium für zellfreies Virus:

50%	Medium
50%	Sucrosephosphat (10% Sucrosephosphat in PBS)

PBS (phosphate-buffered saline) pH 7.4:

5 mM	MgCl ₂
9 mM	CaCl ₂
136 mM	NaCl
2.6 mM	KCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄
1.5 mM	KH ₂ PO ₄

2.9.2 FACS-Messungen**FACS-Puffer**

98 %	steriles PBS	
2 %	FCS	
0.02 %	Natriumazid (NaN ₃)	Sigma

FACS-Blocking

10 % humanes IgG Lösung (Polyglobulin, Bayer) in FACS Puffer

2.9.3 Annexin-Färbung

Binding-Puffer

140 mM NaCl

2.5 mM CaCl₂

10mM HEPES

pH 7.4

2.9.4 Sonstige Puffer und Lösungen

Nicoletti-Färbelösung

250 µl Na-Citrat 0.05 %

250 µl Triton X 0.05 %

25 µl Propidiumjodid (1mg/ml) Sigma

3 Methoden

3.1 Zellkultivierung und Einfrieren von Zellen

3.1.1 Kultivierung humaner Vorhautfibroblasten (HFF, human foreskin fibroblasts)

Monolayer-Kulturen von HFF wurden in CO₂ (5%) begasten Brutschränken bei 37°C in ihrem o.g. Kulturmedium inkubiert.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von ca. 1×10^5 /ml ausgesät und nach Erreichen einer konfluenten Monolayerkultur (eine Woche nach Passagierung) erneut passagiert. Nach Abnahme des Mediums wurde der Zellrasen mit 0,002 % EDTA in PBS gewaschen, um die Ca²⁺-Ionen zu binden und das Ablösen der Zellen zu erleichtern.

Die Zellen wurden anschließend für drei bis fünf Minuten bei 37°C mit Trypsin (0,025 %) / EDTA inkubiert und suspendiert. Anschließend wurde der Trypsinverdau durch Zugabe von Kulturmedium (10% FCS) abgestoppt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

Es erfolgt eine erneute Aussaat mit einer Zelldichte von 1×10^5 /ml.

Eine Kontamination mit Mycoplasmen wurde mittels Mycoplasmen-PCR (Stratagene, Cloning Systems, La Jolla CA) ausgeschlossen.

3.1.2 Kultivierung von glatten Gefäßmuskelzellen (SMC, smooth muscle cells)

Monolayer-Kulturen von SMC wurden in CO₂ (5%) begasten Brutschränken bei 37°C in ihrem o.g. Kulturmedium inkubiert.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von ca. 1×10^5 /ml ausgesät und nach Erreichen einer konfluenten Monolayerkultur (ein bis zwei Wochen nach Passagierung) erneut passagiert. Das Kulturmedium, bestehend aus SmBM + SmGM (Insulin, hFGF-B, GA1000, FBS, hEGF) wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Nach Abnahme des Mediums wurde der Zellrasen mit 0,002 % EDTA in PBS gewaschen, um die Ca²⁺-Ionen zu binden und das Ablösen der Zellen zu erleichtern.

Die Zellen wurden anschließend für drei bis fünf Minuten bei 37°C mit Trypsin (0,025 %) / EDTA inkubiert und suspendiert. Anschließend wurde der Trypsinverdau durch Zugabe der dreifachen Menge von TNS abgestoppt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

Es erfolgt eine erneute Aussaat mit einer Zelldichte von 1×10^5 /ml.

3.1.3 Kultivierung von humanen Umbilicalvenenendothelzellen (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells)

Monolayer-Kulturen von SMC wurden in CO₂ (5%) begasten Brutschränken bei 37°C in ihrem o.g. Kulturmedium inkubiert.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von ca. 1×10^5 /ml ausgesät und nach Erreichen einer konfluenten Monolayerkultur erneut passagiert. Das Kulturmedium, bestehend aus EBM + EGMßMV (hEGF, HC, GA1000, BBE, FBS) wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Nach Abnahme des Mediums wurde der Zellrasen mit 0,002 % EDTA in PBS gewaschen, um die Ca²⁺-Ionen zu binden und das Ablösen der Zellen zu erleichtern.

Die Zellen wurden anschließend für drei bis fünf Minuten bei 37°C mit Trypsin (0,025 %) / EDTA inkubiert und suspendiert. Anschließend wurde der Trypsinverdau durch Zugabe der dreifachen Menge von TNS abgestoppt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

Es erfolgt eine erneute Aussaat mit einer Zelldichte von $1 \times 10^5/\text{ml}$.

Das Kulturmedium, bestehend aus EBM + EGMßMV (hEGF, HC, GA1000, BBE, FBS) wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

3.1.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden nach Erreichen von Konfluenz in der Zellkulturfläche nach o.g. Protokoll abgelöst.

Die Zellen wurden in Kryomedium (10% DMSO, 20% FCS) auf Eis resuspendiert und langsam auf – 80°C gekühlt. Anschliessend wurden die Proben aliquotiert in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte zügig im Wasserbad (37°C). Anschließend wurden die Zellen in einem neuen Kulturmedium in frische Kulturgefäße ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Reste des Kryomediums zu entfernen.

3.2 Viruskultivierung, Austitration und Infektion

3.2.1 Infektion

Zellfreie Infektion:

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen mit einem Faktor von 1:1,5 gesplittet. Die HFF wurden für jeden Versuch mit einem MOI von 2 mit dem jeweils verwendeten Virus infiziert. Um eine gute Infektion zu erreichen, wurden die Zellen zweimal mit 750 g für 15 Minuten zentrifugiert. Nach zwei Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um nicht gebundene Viren zu entfernen und eine gleichmäßige Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.

3.2.2 Virusstock–Herstellung

Ausgangsmaterial für die Herstellung von zellfreien HCMV-Virusstocklösungen waren HFF (16x175 cm²). Die zellassozierte Infektion dieser HFF erfolgte durch Zugabe HCMV-infizierter HFF. Der Fortgang der Infektion wurde täglich mit dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Bereits am ersten Tag p.i. wurden zytopathische Effekte (CPE) im gesamten HFF-Zellrasen sichtbar. Nach ca. fünf Tagen wurde damit begonnen, infizierten Zellüberstand abzunehmen, über mehrere Tage täglich zu sammeln und bei 4°C zu asservieren. Die kumulativen Zellkulturüberstände von ca. fünf aufeinanderfolgenden Tagen wurden zusammen aufgearbeitet. Gesammelte Medien wurden durch Zentrifugation 20 Minuten bei 3.500 rpm in der Kühlzentrifuge von den zellulären Überresten befreit. Der virushaltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und gesammelt. Das sich in dem nun zellfreien Medium befindende Virus wurde durch Ultrazentrifugation 60 Minuten bei 25.000 rpm in der Ultrazentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet in Kryomedium (Succosephosphat Puffer) resuspendiert und aliquotiert bei –80°C eingefroren.

Die Konzentration infektiöser Einheiten in den kryokonservierten Virusstocklösungen wurde durch Titration in Zellkultur bestimmt. Aus diesen Viren wurden Virusstocks für AD169 ($1,7 \times 10^7$ /ml), TB40E ($1,5 \times 10^7$ /ml), TB40F ($1,5 \times 10^7$ /ml), Towne ($2,5 \times 10^8$ /ml) und Toledo ($4,4 \times 10^5$ /ml) hergestellt.

3.2.3 Titerbestimmung der HCMV- Isolate

Zur Quantifizierung infektiöser Einheiten in den HCMV-Virus-Stocklösungen wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (Titration) und nicht-infizierte HFF (2×10^4 /Vertiefung) mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Virus unbekannter Konzentration in 96-well-Titerplatten inkubiert (unverdünnt, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Nach einer Zentrifugation von je 15 Minuten bei 2.000 rpm wurden die Mikrotiterplatten für 48 - 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

Eine Detektion von HCMV-Early–Antigen (Antikörper Clon CCH2) wurde nach 48 Stunden durchgeführt.

Das Medium wurde per Vakuumpumpe entfernt, die Mikrotiterplatte mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit Early–Antikörpern (Clone CCH2,

1:100, 30 Minuten, Raumtemperatur) inkubiert. Nach mehrmaligen Waschen wurden die infizierten Zellkulturen mit einem zweiten konjugierten Antikörper mit anschließender Immunperoxidasebehandlung mit AEC gefärbt („Staining“ nach Gleaves et al., 1987).

Die Anzahl der infizierten Zellen wurde dann durch Auszählen der Zellen mit gefärbten Zellkernen unter Ausgrenzung von Färbeartefakten unter dem Zählmikroskop bestimmt.

3.3 Durchflußzytometrie

3.3.1 Methodische Grundlagen

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie kann kumulativ an mehreren Tausend Suspensionszellen Zellmorphologie und Fluoreszenzintensität untersucht werden. Verwendet wurde dazu ein FACScan Gerät der Firma Becton & Dickinson, sowie ein daran angeschlossener Apple Macintosh Computer mit CellQuest Software zur Darstellung und Analyse der gelieferten Daten.

Die Abkürzung FACS steht für **F**luorescence **A**nalysing **C**ell **S**orting.



Abbildung 4: Becton & Dickinson FACScan

Neben der Analyse der Intensität und Art der Fluoreszenz liefert das FACS auch Informationen über Größe und Granularität der gemessenen Zellen.

Der Ablauf der Analyse ist wie folgt:

Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden in FACS-Puffer in Lösung gebracht und in den Probenhalter gestellt. Das Gerät benutzt einen Unterdruck in Verbindung mit einem unter Druck stehenden Transportsystem (Abb. 5), um die in der Lösung befindlichen Zellen an der Messeinheit vorbei zu transportieren.

Über einen vorgeschalteten Trichter im Flüssigkeitsstrom werden die Zellen durch Erhöhung der Flussgeschwindigkeit für die Messung vereinzelt (fokussiert) und vom Messlaser mit einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die dabei entstehende Emissionsstrahlung wird von spezifischen Messzellen gemessen. (530 nm für FITC (grün) und 585 nm für PE (rot))

Durch verschiedene Messzellen können nun unterschiedliche Aspekte der gemessenen Zellen bestimmt werden. Das Setup wird in folgendem Schaubild dargestellt.

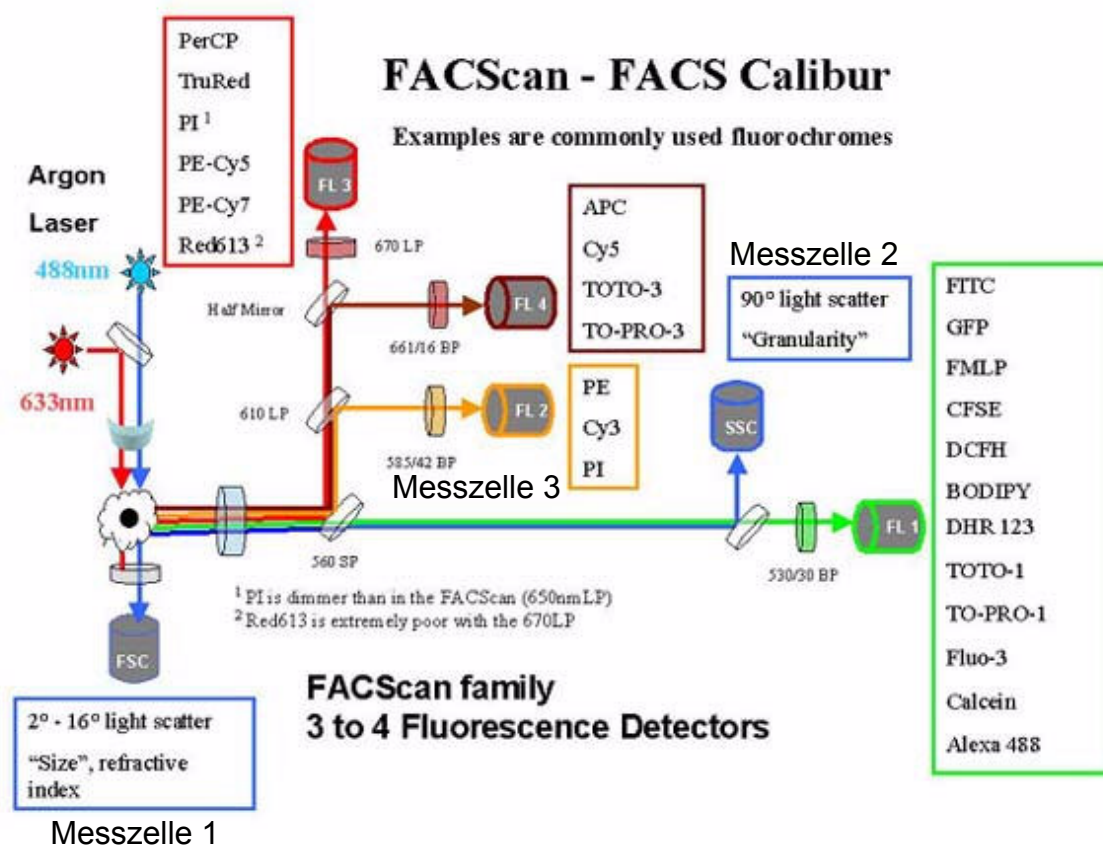


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines FACS - Gerätes

Messzelle 1 (dem Messlaser genau gegenüber) misst die Absorption des Lasers (FSC = Forward Scatter). Mit der Absorption kann bestimmt werden, welchen

Durchmesser die Zelle hat. Je größer der Durchmesser, je stärker die Absorption d.h. Abschwächung des Lasers.

Messzelle 2 (um den Laser verteilt) misst die Streuung des eingestrahlt Lichtes SSC = Sideward Scatter. Je mehr Partikel / Zellorganellen usw. sich in der Zelle befinden, desto stärker wird das Licht beim Durchtritt durch die Zelle gestreut, d.h. die Streuung des Lichtes ist proportional zur Granularität der Zelle.

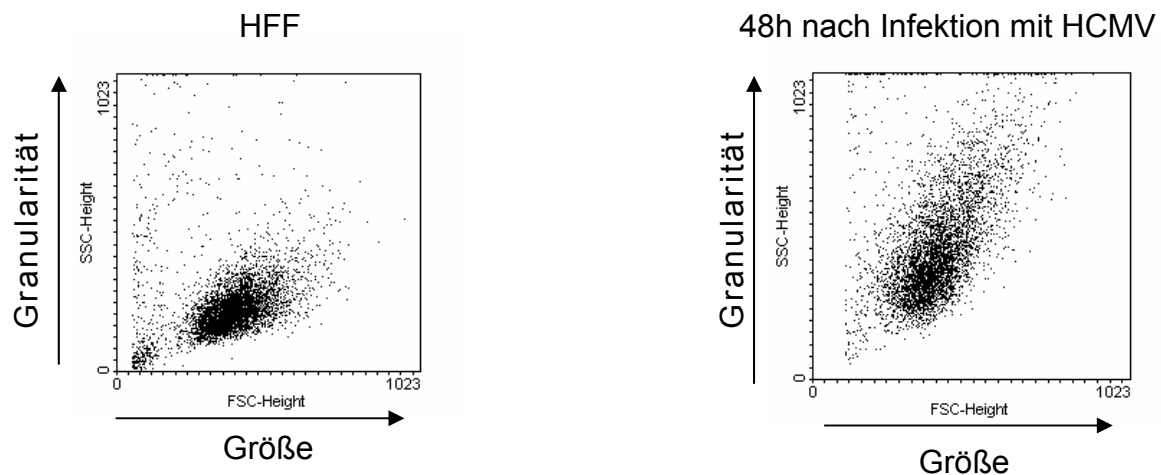


Abbildung 6: Darstellung von FSC gegenüber SSC mit erhöhter Granularität (SSC) nach HCMV Infektion

Eine zusätzliche Messzelle (Messzelle 3) misst spezifisch die vom aktivierten Fluoreszenzfarbstoff ausgehende Lichtmenge. Mit dieser Messzelle wird die Färbung der Zelle mit dem Farbstoff gemessen.

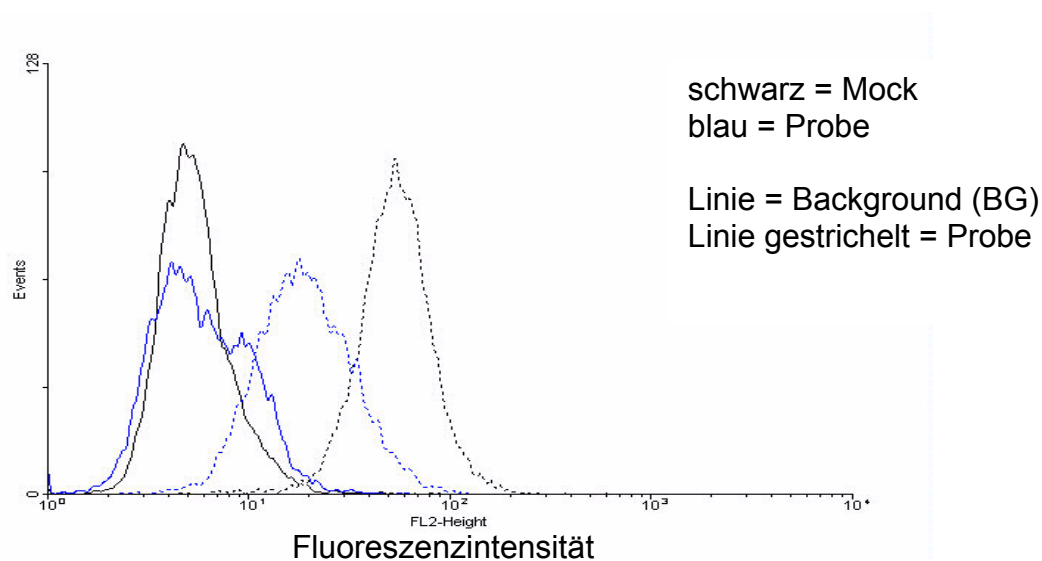


Abbildung 7: Diagramm der Fluoreszenzintensität

Die gemessenen Daten werden vom FACScan auf den angeschlossenen Apple Macintosh-Computer übertragen, wo sie in Echtzeit dargestellt und gespeichert werden. Die Analyse und graphische Darstellung der Daten wurde mit dem Programm WinMDI (**Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry**) V2.8 von Joe Trotter (Scripps Research Institute, USA) vorgenommen.

3.3.2 Durchführung der Zellpräparation zur Analyse von Oberflächenantigenen

Durch Trypsin-Behandlung wurden die Zellen vereinzelt und in Suspension gebracht. Durch zweifaches Waschen und Zentrifugieren für zehn Minuten bei 1.200 rpm bei 4°C mit PBS wurden die Reste aus der Trypsinierungsreaktion entfernt. Um eine unerwünschte, unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden, wurde für 30 Minuten mit humanem IgG (Polyglobulin) bei 4°C inkubiert. Nach zweifachem Waschen und Zentrifugieren mit FACS-Puffer wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und jeweils 100 µl auf die passende Anzahl von FACS-Röhrchen verteilt.

Nach Zugabe des ersten, nicht konjugierten Antikörpers (monoklonal, Maus, 2 µl) wurden die Röhrchen bei 4°C auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Um den Primärantikörper zu entfernen, wurde danach zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Danach wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (anti-mouse – PE, DAKO) zugegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Für die Messung des Background wurde die Probe nur mit dem Sekundärantikörper behandelt. Daran schlossen sich zwei Waschschritte mit FACS-Puffer an.

Zur Analyse wurde das Pellet mit 400 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Analyse durchgeführt.

Als Kontrolle der Expression wurde eine nicht-infizierte Probe nach o.g. Schema behandelt und in der Messreihe mit untersucht.

3.3.3 Auswertung für Oberflächenantigenbestimmung

Die Analyse der Rohdaten wurde an einem Windows NT Rechner unter der Verwendung von WinMDI und MS Excel durchgeführt.

Über die Statistikfunktion der WinMDI-Software wurden die Mediane der gemessenen Fluoreszenzkurven bestimmt. Die prozentuale Änderung der Fluoreszenzintensität der HCMV-infizierten Zellen zur mock-infizierten Kontrolle wurden wie folgt berechnet.

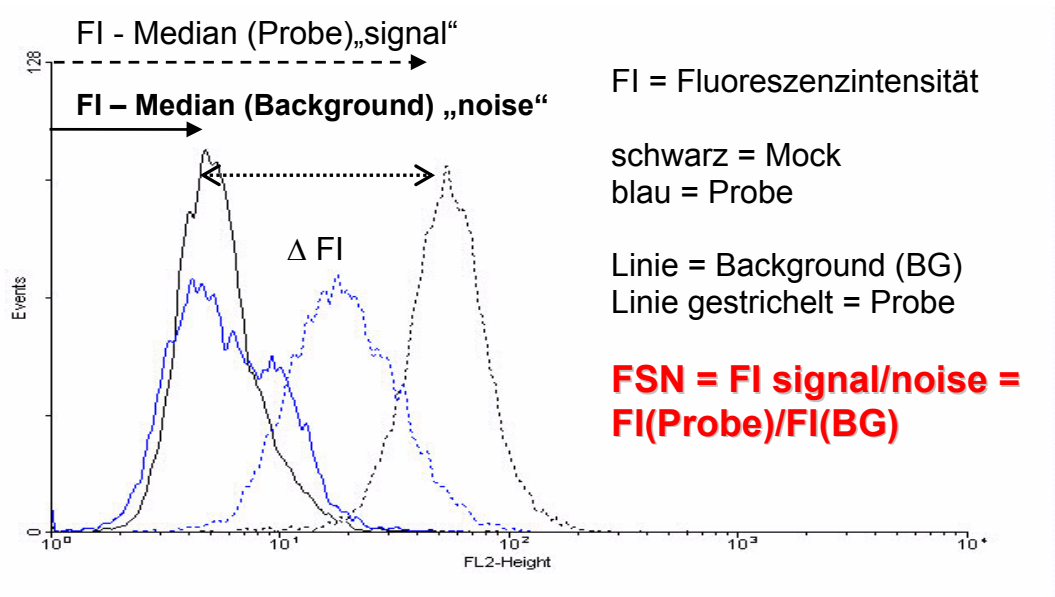


Abbildung 8: Auswertung der Fluoreszenzintensitäten

Es wurde also jeweils der Median der gemessenen Proben durch den Median der Fluoreszenzintensität der Eigenfluoreszenz (Backgroundprobe) geteilt. Um anschließend die Veränderung der Fluoreszenzintensität unter dem Einfluss von viraler Infektion zu erkennen, wurden die bestimmten Fluoreszenz–Signal to Noise (FSN)–Ratios wieder zueinander in Verhältnis gesetzt.

Die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten wurden als Säulendiagramm dargestellt.

Die Streubreite (range) wiederholter, unabhängiger Messungen wurde zusammen mit dem Median berechnet.

3.3.4 Durchführung für Apoptosemessung

Nach Trypsinbehandlung wurden alle Zellen in Medium aufgenommen, mit PBS gewaschen und jeweils zehn Minuten bei 1200 rpm bei 4°C abzentrifugiert und mit 2% Polyglobulin in Binding-Puffer für 30 Minuten bei 4°C geblockt. Danach wurde mit Binding-Puffer für zehn Minuten bei 1.200 rpm gewaschen.

3.3.4.1 Annexin–FITC-Staining

2 µl Annexin V–FITC Antikörper wurde zugegeben und für 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Daran anschließend wurde für zehn Minuten bei 1.200 rpm gewaschen.

Das Pellet wurde in Propidiumjodidfärbelösung (0.5 µg PrJ/ml) resuspendiert und innerhalb von zehn Minuten wurde mit der ersten Analyse begonnen.

3.3.4.2 Nicoletti-Färbung

Die Proben wurden für 15 Minuten bei 2000 g pelletiert und in 500 µl Nicoletti–Lösung resuspendiert. Die Proben wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit dem Vortex sorgfältig durchmischt und die zweite Analyse durchgeführt.

Alle Zellen, die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden, sind rein Annexin-FITC positiv (FL1) und PJ negativ (FL2). Im Gegensatz dazu sind nekrotische Zellen PJ-positiv (FL2) und Annexin-FITC negativ (FL1).

Im folgenden Dot–Blot wurde die Fluoreszenzintensität 1 (grün) gegen die Fluoreszenzintensität 2 (rot) aufgetragen.

Mit der Statistikfunktion von WinMDI wurden dann über ein eingelegtes Raster die Annexin–positiven Zellen identifiziert. Als Annexin-positiv wurden die Zellen betrachtet, die eine Fluoreszenz größer 10^2 auf der FL1-Height Skala hatten.

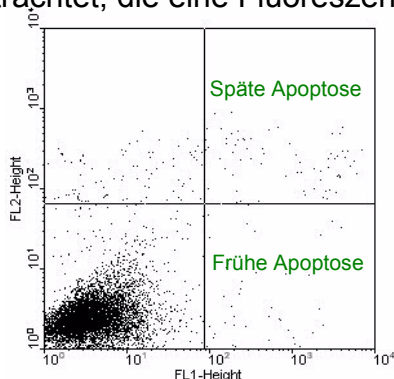


Abbildung 9: Dot – Blot Apoptosemessung

3.3.4.3 Messung morphologischer Veränderungen

Zellen mit morphologischen Veränderungen als Zeichen der Apoptose werden kleiner und kondensieren (shrinking). Sie wurden durch Bestimmung veränderter FCS gegenüber SCC, also Größe gegenüber Granularität, detektiert (R1).

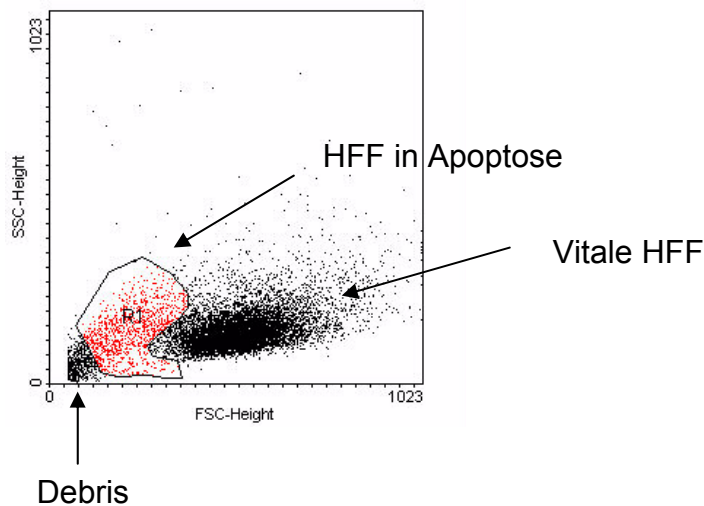


Abbildung 10: Nachweis morphologischer Veränderungen durch verändertes Streulicht /FSC/SSC) in der Durchflußzytometrie

3.3.4.4 Messung der DNA - Fragmentierung

Durch Inkubation mit Nicoletti-Färbelösung (hypotoner PI Lösung) werden Zellen lysiert und PI in DNA inkorporiert. In den so präparierten Kernen wurde dann der Anteil an fragmentierter DNA, als spätes Zeichen von Apoptose bestimmt. Die DNA-Färbung wurde mit der Propidiumjodid - Färbelösung durchgeführt.

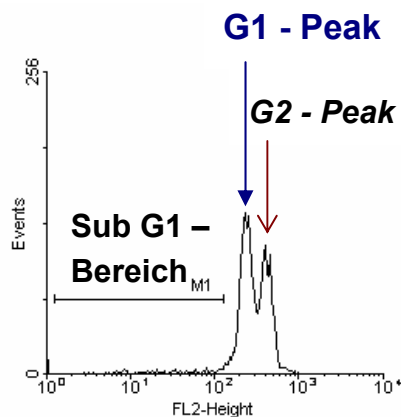


Abbildung 11: DNA-Gehalt Histogramm Nicoletti – Messung ohne Zeichen der Apoptose

Bei der Messung im Durchflusszytometer wurden der G1- und der G2-Peak der gemessenen DNA der Zellen erkannt. Der G1-Peak repräsentiert die Zellen mit einfachem Chromosomensatz ($n=2$), während der G2-Peak die Zellen mit doppeltem Chromosomensatz ($n=4$) darstellt.

Zellen mit DNA-Fragmentation durch Apoptose zeigen einen verminderten DNA-Gehalt, und zeichnen sich durch verminderte Fluoreszenz in der Durchflußzytometrie aus (sub G1-Bereich).

3.4 Statistik „Wilcoxon-Test“

Der Wilcoxon-Test ist eine multiple Rangvarianzanalyse von abhängigen Stichproben, die nicht normalverteilt zu sein brauchen.

Es lässt eine Aussage darüber zu, zwischen welchen gemittelten Messwerten ein signifikanter Unterschied besteht.

Die Auswertung wurde mit dem Programm „Prism“ der Firma GraphPad durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Apoptoserezeptoren CD95, TNF-R1 und TNF-R2

Auf humanen Vorhautfibroblasten (HFF) war CD95 (Abb. 12A) und TNF-R1 (Abb. 13A) konstitutionell exprimiert. TNF-R2 war auf mock-infizierten HFF nicht nachweisbar (Abb. 14A). Als Kontrollantigen wurde die Expression von HLA-I (Abb. 15A) bestimmt.

Die veränderte Expression des CD95–Oberflächenrezeptors wurde 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion mit verschiedenen HCMV-Stämmen untersucht. Bis 24 Stunden p.i. kam es zu keiner Veränderung der Expression. Die Expression von CD95 auf HFF zeigt 48 Stunden bis 96 Stunden p.i. für alle getesteten Virusstämme eine verminderte Expression um ca. 50%. Nach Behandlung mit UV–inaktivierten Varianten war eine sichere Modulation der Rezeptordichte (>50%) nicht nachweisbar.

Die veränderte Expression von TNF–Rezeptor 1 wurde 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion mit verschiedenen HCMV-Stämmen untersucht. Bis 24 Stunden p.i. kam es zu keiner Veränderung der Expression. Die Expression von TNF – R1 auf HFF zeigt im Zeitraum von 48 Stunden bis 96 Stunden p.i. für alle getesteten Virusstämme eine verminderte Expression um ca. 50%. Nach Behandlung mit UV – inaktivierten Varianten war eine Modulation der Rezeptordichte 72 Stunden p.i. ebenfalls nachweisbar.

Die veränderte Expression von TNF–Rezeptor 2 wurde 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion mit verschiedenen HCMV Stämmen untersucht. 24 bis 48 Stunden p.i. war die Expression von TNF – R2 nicht sicher nachweisbar. 72 Stunden und 96 Stunden p.i. konnte eine geringe Expression von TNF–R2 auf HFF gezeigt werden. Nach Behandlung mit UV – inaktivierten Varianten war eine sichere Modulation der Rezeptordichte (>50%) nicht nachweisbar. Nur 48 Stunden p.i. war die Expression von TNF-R2 nach Inkubation mit UV-inaktiviertem AD169 CMV-Stamm einmalig nachweisbar.

Als Kontrollantigen wurde die Expression von HLA-I 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion mit verschiedenen HCMV Stämmen untersucht. Dabei zeigte sich die in der Literatur bereits beschriebene verminderte Expression um ca. 50% ab 48 Stunden p.i. für alle untersuchten Virusstämme.

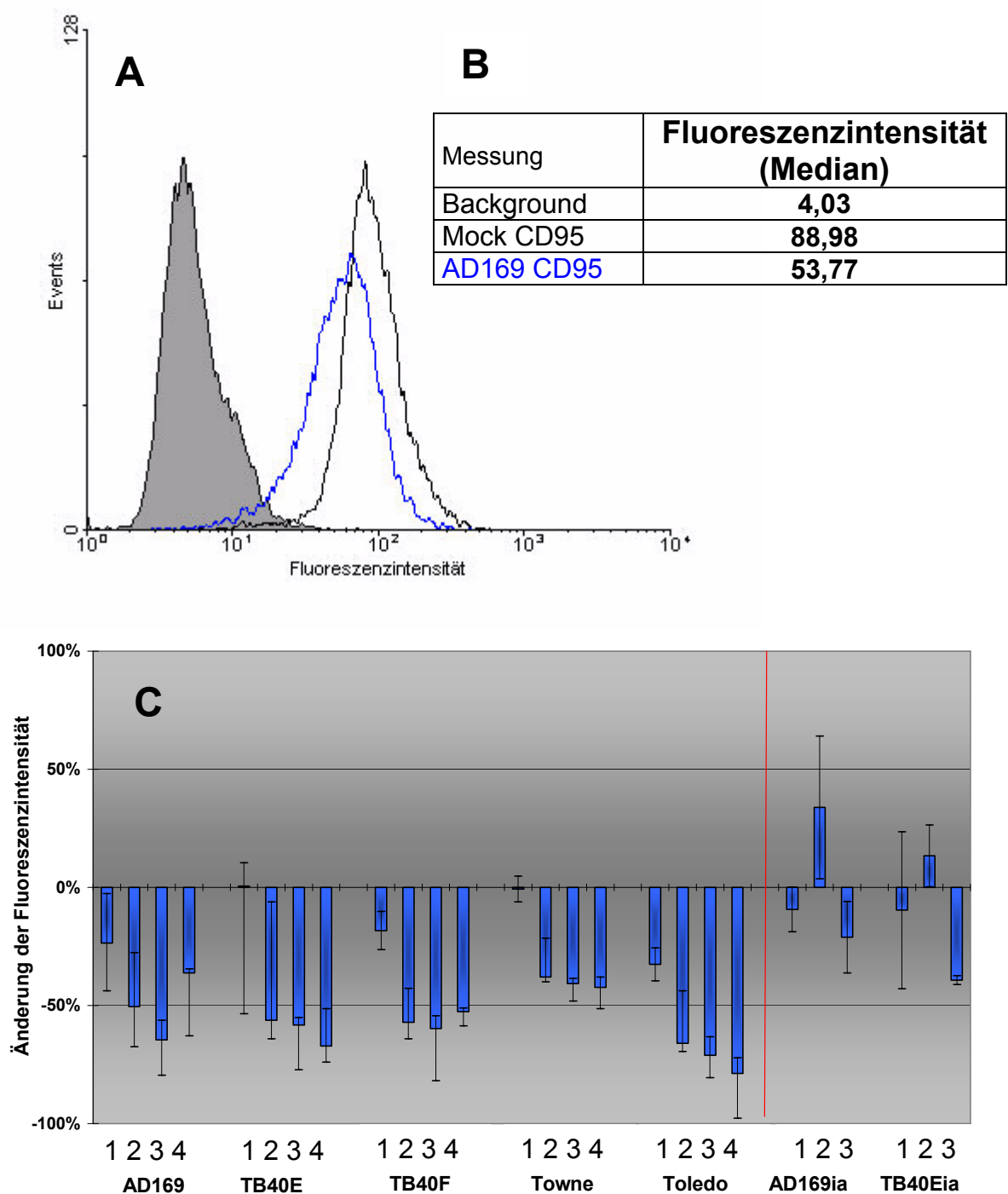


Abb. 12: Expression von CD95 in HFF nach Infektion mit HCMV-Varianten. Beispiel für veränderte CD95-Expression dargestellt als Histogramm (72h p.i.) (A) oder als Median der Fluoreszenzintensität (B). Kumulative Darstellung veränderter Fluoreszenzintensität nach Infektion mit HCMV-Varianten im zeitlichen Verlauf (C). Zeitpunkt 1 (24h p.i.), 2 (48h p.i.), 3 (72h p.i.) und 4 (96h p.i.) wurden in mindestens 3 Experimenten unabhängig getestet.

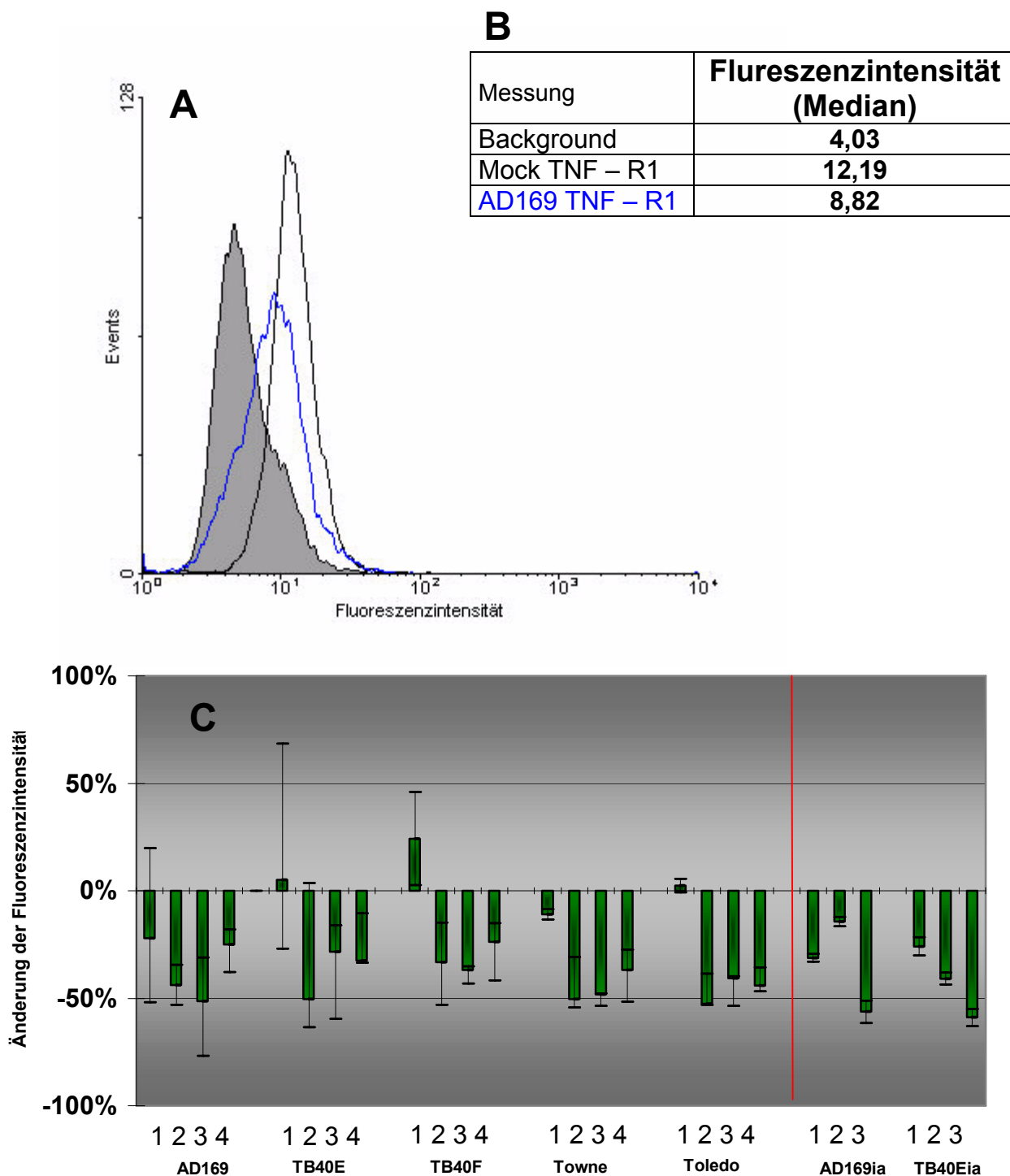


Abb. 13: Expression von TNF-Rezeptor 1 in HFF nach Infektion mit HCMV-Varianten. Beispiel für veränderte TNF-Rezeptor-1- Expression dargestellt als Histogramm (72h p.i.) (A) oder als Median der Fluoreszenzintensität (B). Kumulative Darstellung veränderter Fluoreszenzintensität nach Infektion mit HCMV-Varianten im zeitlichen Verlauf (C). Zeitpunkt 1 (24h p.i.), 2 (48h p.i.), 3 (72h p.i.) und 4 (96h p.i.) wurden in mindestens 3 Experimenten unabhängig getestet.

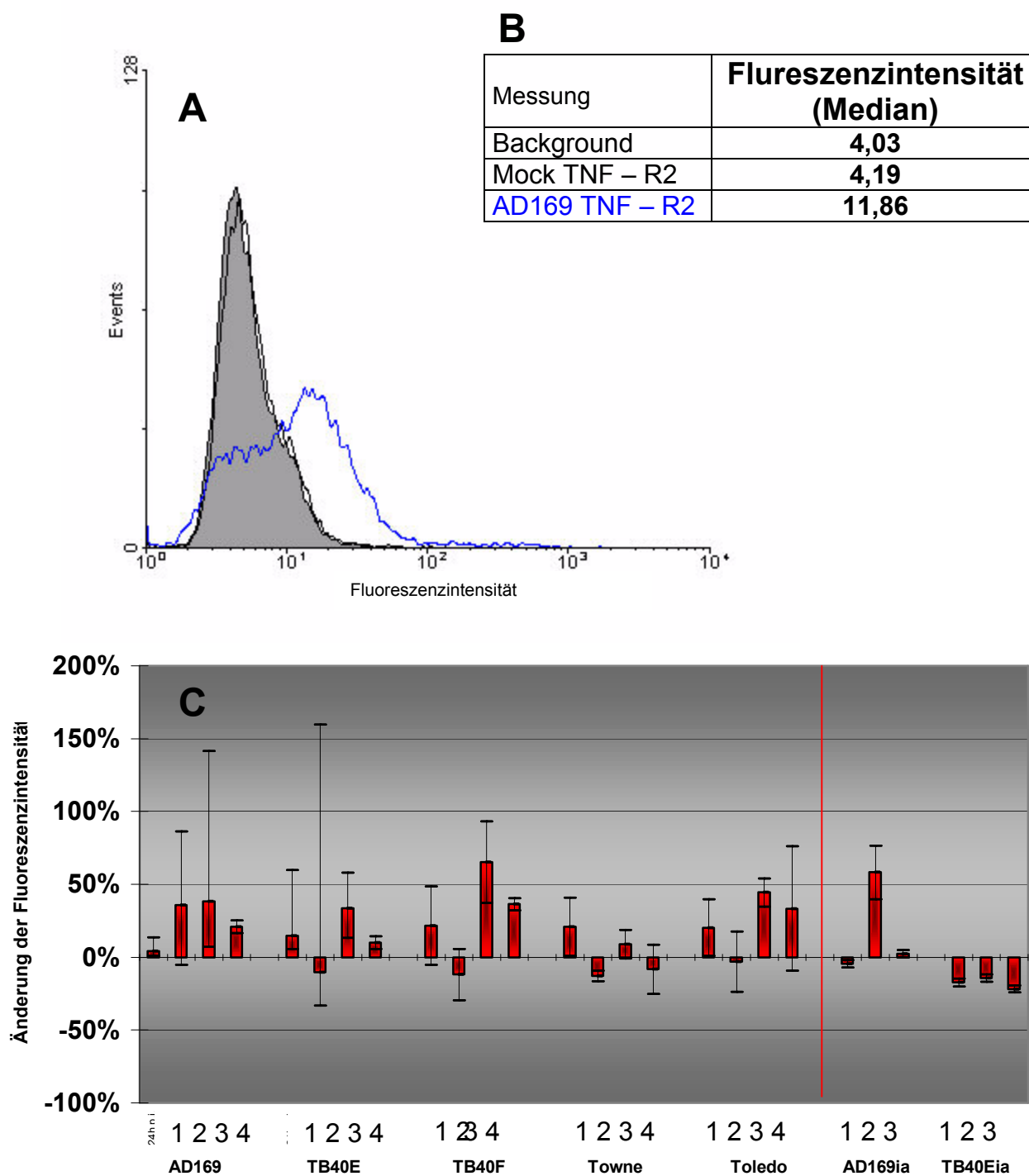


Abb. 14: Expression von TNF-Rezeptor 2 in HFF nach Infektion mit HCMV-Varianten. Beispiel für veränderte TNF-Rezeptor2-Expression dargestellt als Histogramm (72h p.i.) (A) oder als Median der Fluoreszenzintensität (B). Kumulative Darstellung veränderter Fluoreszenzintensität nach Infektion mit HCMV-Varianten im zeitlichen Verlauf (C). Zeitpunkt 1 (24h p.i.), 2 (48h p.i.), 3 (72h p.i.) und 4 (96h p.i.) wurden in mindestens 3 Experimenten unabhängig getestet.

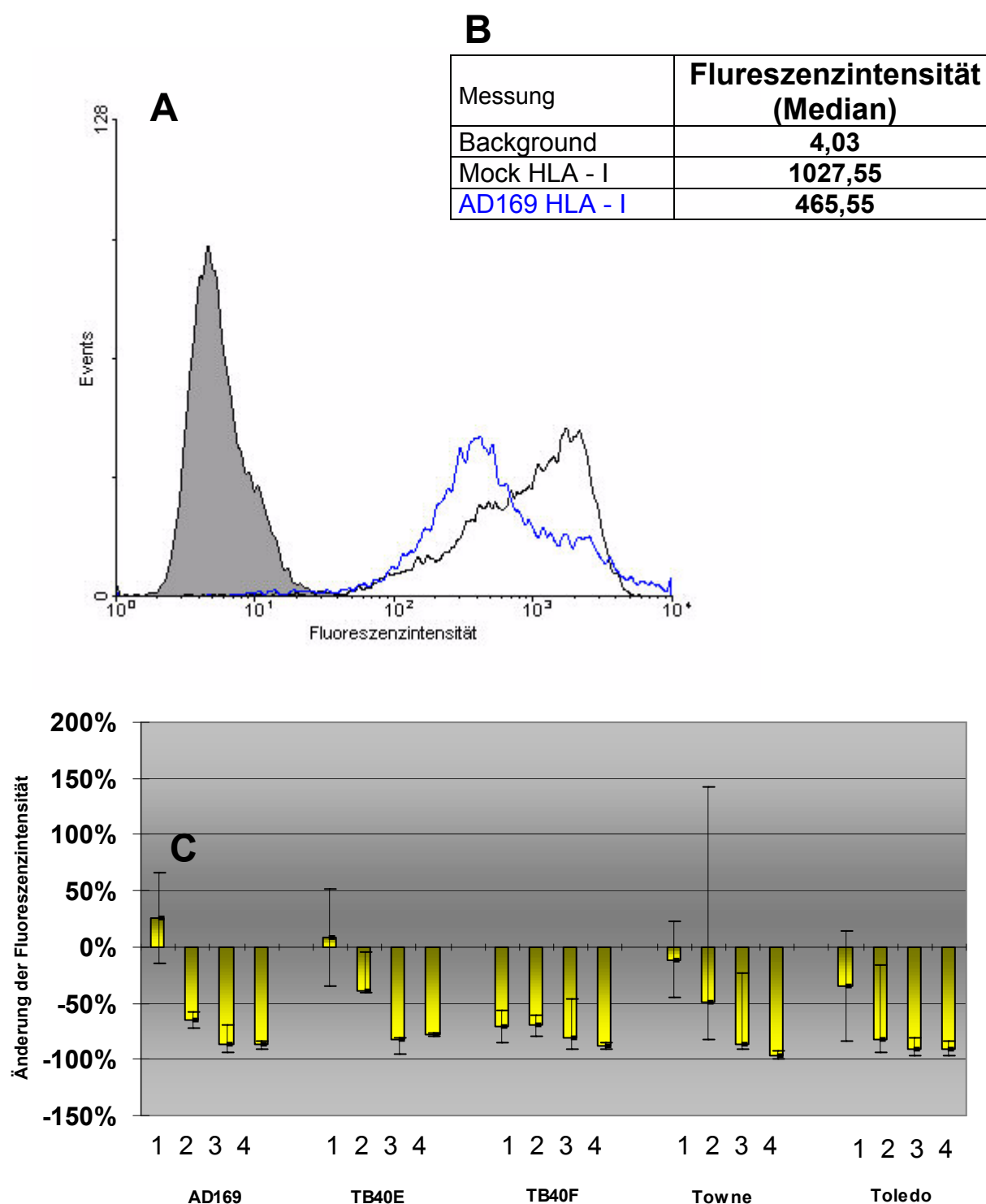


Abb. 15: Expression von HLA-I in HFF nach Infektion mit HCMV-Varianten. Beispiel für veränderte HLA-I Expression dargestellt als Histogramm (72h p.i.) (A) oder als Median der Fluoreszenzintensität (B). Kumulative Darstellung veränderter Fluoreszenzintensität nach Infektion mit HCMV-Varianten im zeitlichen Verlauf (C). Zeitpunkt 1 (24h p.i.), 2 (48h p.i.), 3 (72h p.i.) und 4 (96h p.i.) wurden in mindestens 3 Experimenten unabhängig getestet.

4.2 Analyse der Apoptosesensitivität nach Infektion mit HCMV Varianten

Als Zeichen von Apoptose wurden morphologische Veränderungen (Zellschrumpfung), die Bindung von Annexin V und die DNA-Fragmentation im Durchflußzytometer bestimmt. Apoptose wurde durch Inkubation mit spezifischen Apoptose-induzierenden Liganden (anti-CD95 AK, TNF- α , TRAIL) induziert.

Nicht-infizierte HFF (Mock) waren gegenüber Stimulation mit apoptoseinduzierenden Liganden resistent (Abb. 16-24).

Bei der Induktion mit anti-CD95 war in mit AD169, TB40F und Towne infizierten HFF eine erhöhte Apoptosesensitivität nachweisbar, TB40E und Toledo waren weiterhin resistent gegenüber Apoptose (Abb. 16).

Dasselbe Profil fand sich auch bei der Stimulation mit TNF (Abb. 17) und TRAIL (Abb. 18).

Im Anschluss wurde der Einfluß verschiedener Infektionszeitpunkte auf die Apoptose untersucht. 4 Stunden p.i. war die spezifische Apoptose für alle untersuchten Parameter <10%. Bereits 24 Stunden p.i. mit AD169 war nach Stimulation mit Apoptose-induzierenden Liganden Apoptose nachweisbar (Abb. 19-21). Nach Infektion mit TB40E und inaktivierten Virusstämmen war zu keinem Infektionszeitpunkt eine gesteigerte Apoptoseempfindlichkeit nachweisbar.

Die unterschiedliche Apoptose-Sensitivität wurde zum Infektionszeitpunkt 48 Stunden p.i. in mindestens vier unabhängigen Experimenten untersucht und statistisch durch Paarvergleich (Wilcoxon-Test) evaluiert (Abb. 22, 23, 24). Dabei zeigte sich, dass Unterschiede der Apoptose-Sensitivität nach Infektion mit AD169 durch Bestimmung der veränderten Morphologie und der Annexin V-Bindung stets nachweisbar waren ($p < 0.05$). Die Bestimmung der DNA-Fragmentation zeigte signifikante Unterschiede nur nach Stimulation mit TNF ($p < 0,05$).

Die veränderte Expression von CD95 und TNF-R1 durch HCMV wurde anschließend in anderen Zellkultursystemen nach Infektion mit TB40E untersucht (SMC, AEC, HCAEC, HUVEC). Der HCMV-Stamm TB40E wurde aufgrund des breiten Zelltropismus gewählt. Mit Hilfe durchflußzytometrischer Untersuchungen wurde eine unterschiedliche Modulation apoptosevermittelnder Rezeptoren in SMC, AEC, HCAEC und HUVEC nachgewiesen. Dabei führt die HCMV-Infektion

zu einer verminderten Expression von CD95 und einer geringgradig gesteigerten Expression von TNF-R1 auf SMC.

Bei Endothelzellen (AEC, HCAEC und HUVEC) führte die HCMV-Infektion eher zu einer verstärkten Expression von CD95, während die Expression von TNF-R1 nicht beeinflusst wurde (Tabelle 2).

Die Apoptosesensitivität von HCAEC, AEC und SMC (Abb. 25) war nach Infektion mit TB40E nahezu unverändert, wobei auch nach Infektion von HFF mit TB40E – wie bereits gezeigt – keine gesteigerte Apoptosesensitivität nachweisbar war (Tabelle 3). Konfluente HUVEC zeigen ohne Infektion im Gegensatz zu den übrigen Zellkultursystemen eine spontane Apoptose auch ohne Stimulation mit apoptoseinduzierenden Liganden (Abb. 26). Die Infektion mit TB40E führt zu einer Hemmung der Apoptose in HUVEC. Die zusätzliche Stimulation mit Apoptose-induzierenden Liganden war ohne Einfluß auf die Apoptose.

Einfluß verschiedener HCMV Varianten auf die Apoptose Sensitivität

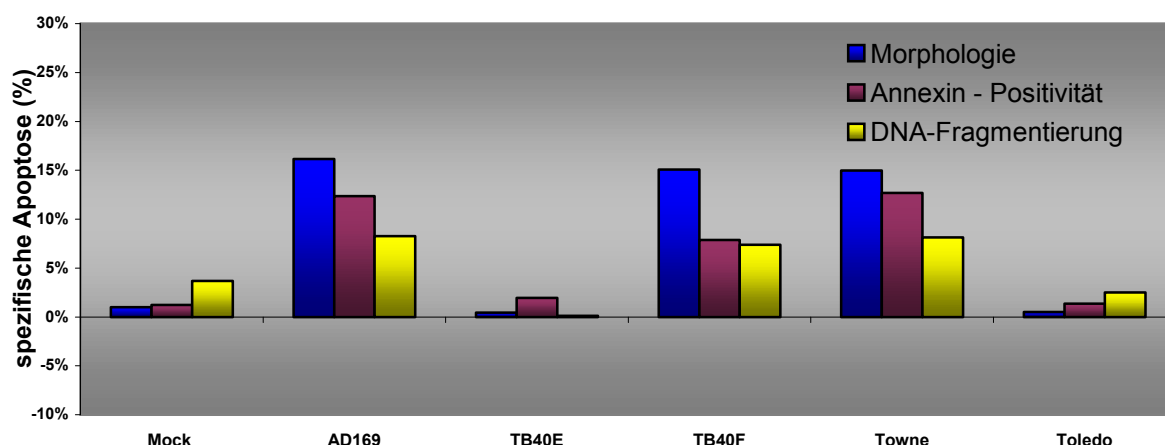


Abb. 16: Apoptose Sensitivität von HFF 48 Stunden nach Infektion mit HCMV-Varianten. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Stimulation mit anti CD95 IgG3 + Protein G (5ng/ml) für 16 Stunden.

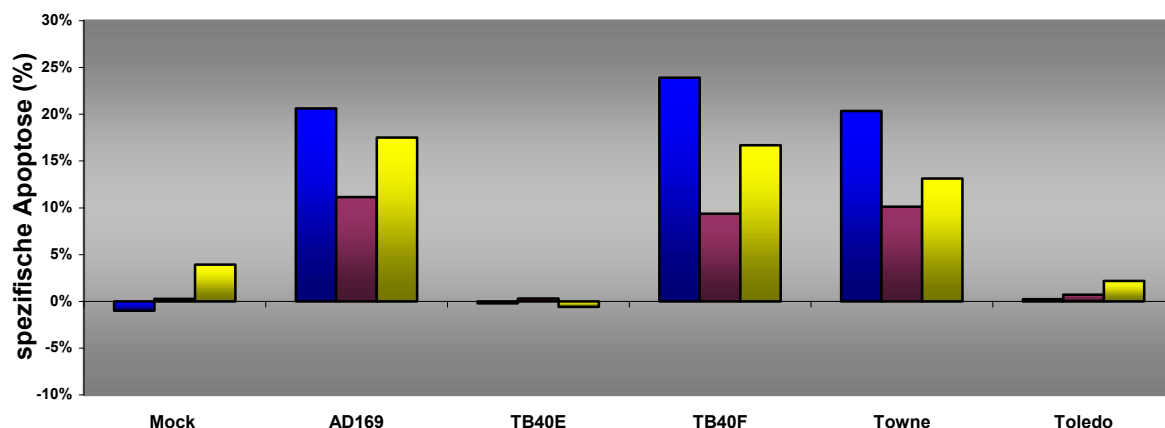


Abb. 17: Apoptose Sensitivität von HFF 48 Stunden nach Infektion mit HCMV-Varianten. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Stimulation mit TNF (1000 U/ml) für 16 Stunden.

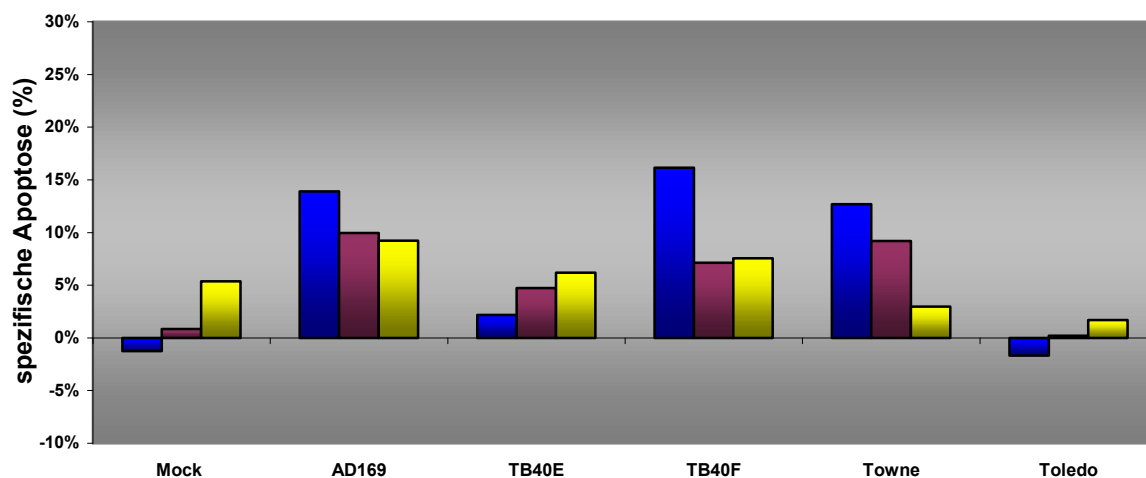


Abb. 18: Apoptose Sensitivität von HFF 48 Stunden nach Infektion mit HCMV Varianten. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Stimulation mit TRAIL (100 ng/ml) für 16 Stunden

Apoptosesensitivität gegen über 3 verschiedenen Liganden 4, 24 und 48 h nach Infektion

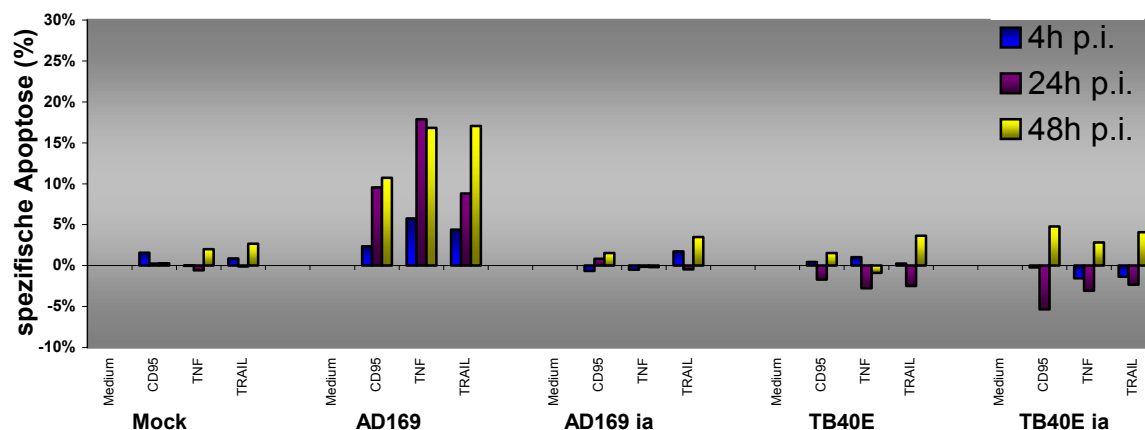


Abb. 19: Morphologische Veränderungen von HFF nach Infektion mit AD169, TB40E bzw. mit UV-inaktivierten Virusstämmen in Abhängigkeit der Liganden und in Abhängigkeit der Zeit p.i.. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Stimulation mit anti-CD95 IgG3 + Protein G (5ng/ml), TNF (1000 U/ml) sowie TRAIL (100 ng/ml) für 16 Stunden.

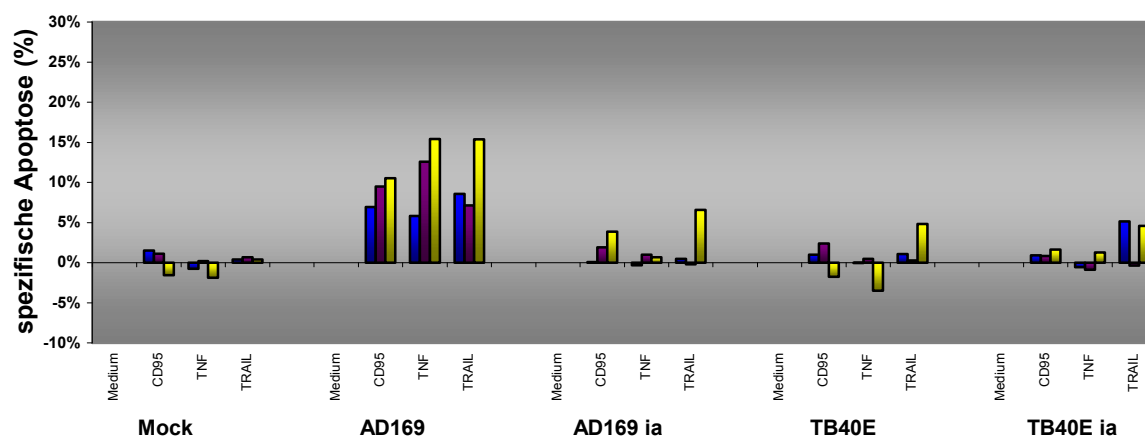


Abb. 20: Annexin-V- Positivität auf HFF nach Infektion mit AD169, TB40E bzw. mit UV-inaktivierten Virusstämmen in Abhängigkeit der Liganden und in Abhängigkeit der Zeit p.i.. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Stimulation mit anti-CD95 IgG3 + Protein G (5ng/ml), TNF (1000 U/ml) sowie TRAIL (100 ng/ml) für 16 Stunden.

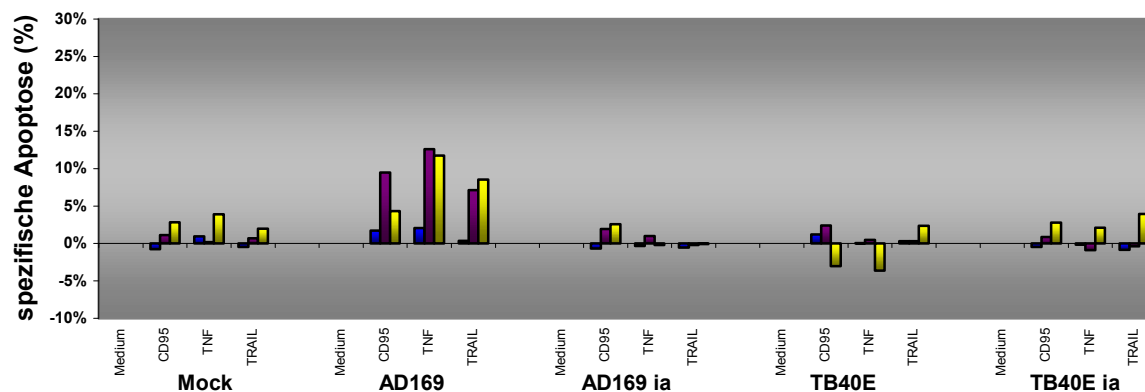


Abb. 21: DNA – Fragmentierung bei HFF nach Infektion mit AD169, TB40E bzw. mit UV-inaktivierten Virusstämmen in Abhängigkeit der Liganden und in Abhängigkeit der Zeit p.i.. Die Induktion der Apoptose erfolgte durch Stimulation mit anti-CD95 IgG3 + Protein G (5ng/ml), TNF (1000 U/ml) sowie TRAIL (100 ng/ml) für 16 Stunden.

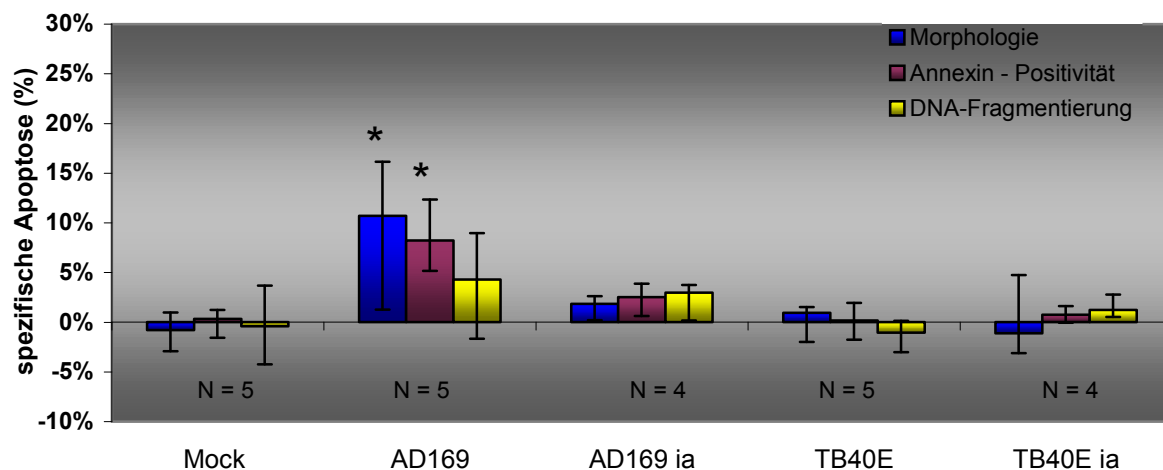


Abb. 22: Apoptosesensitivität von HFF nach Infektion mit AD169, TB40E bzw. mit UV-inaktivierten Virusstämmen. Die Induktion der Apoptose erfolgte mit anti-CD95 IgG3 + Protein G (5ng/ml) für 16 Stunden.

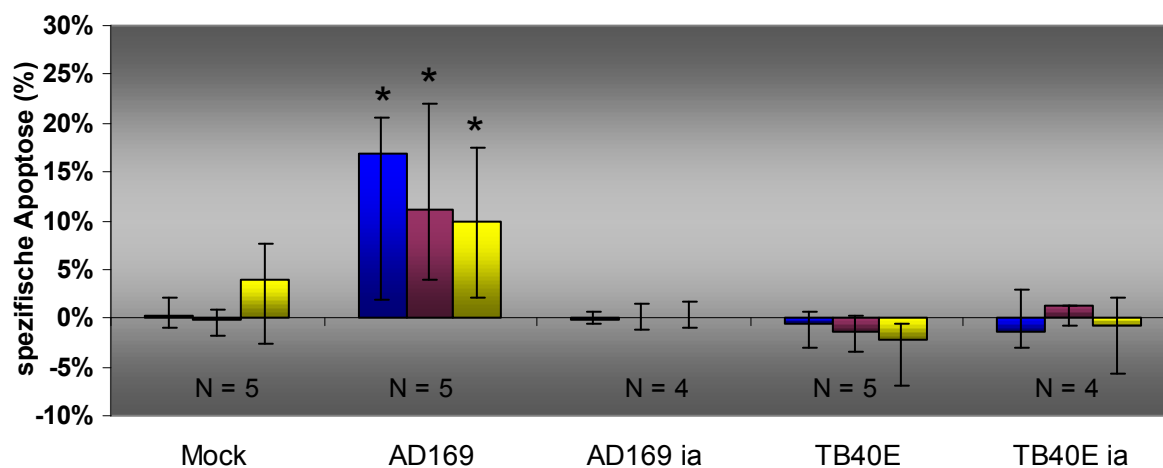


Abb. 23: Apoptosesensitivität von HFF nach Infektion mit AD169, TB40E bzw. mit UV-inaktivierten Virusstämmen. Die Induktion der Apoptose erfolgte mit TNF (1000 U/ml) für 16 Stunden.

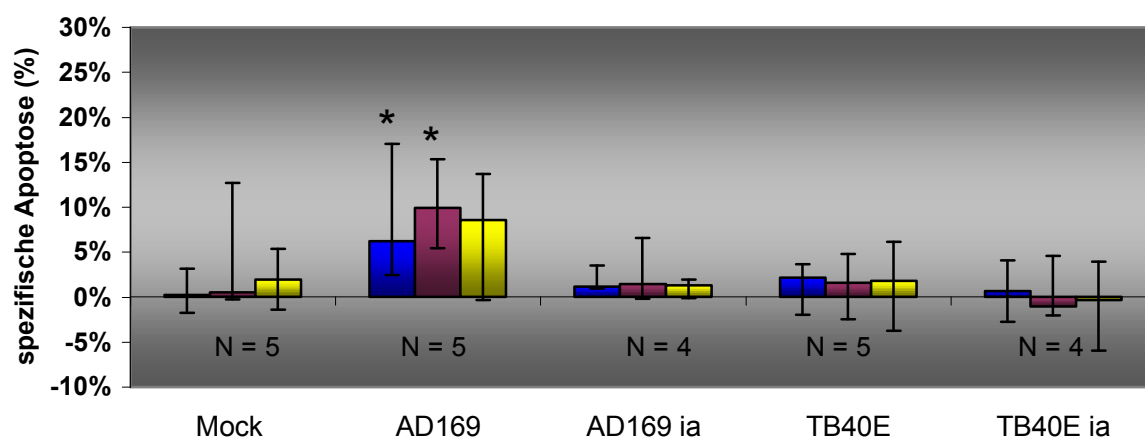


Abb. 24: Apoptosesensitivität von HFF nach Infektion mit AD169, TB40E bzw. mit UV-inaktivierten Virusstämmen. Die Induktion der Apoptose erfolgte mit TNF (1000 U/ml) für 16 Stunden.

* statistisch signifikant im Wilcoxon – Test ($p < 0.05$)

4.3 Übersicht über Expression von Apoptoserezeptoren und Sensitivität für Apoptoseinduktion auf HFF, SMC, AEC, HCAEC, HUVEC

Apoptose - Rezeptoren – Expression

	CD95	TNF-R1	TNF-R2
Mock (alle Zellen)	++	+	(-)
HFF	↓↓↓	↓	(-)
SMC	↓↓↓	↑↑	(-)
AEC	↑	↓	(-)
HCAEC	↑↑	↔	(-)
HUVEC	↑	↔	(-)

Tabelle 2: Übersicht über Expression von Apoptoserezeptoren auf HFF, SMC, AEC, HCAEC, HUVEC

Eine Expressionsänderung von >50% wird durch drei Pfeile dargestellt, 30 – 49% 2 Pfeile, 10 – 29% durch einen Pfeil. Eine Veränderung <10% wird durch waagerechte Pfeile dargestellt.

Apoptose - Sensitivität

	Anti - CD95	TNF-alpha	TRAIL
Mock (alle Zellen)			
HFF	↔	↔	↑
SMC	↔	↔	↔
AEC	↑	↔	↔
HCAEC	↔	↔	↔
HUVEC	Spontane Apoptose ohne Stimulation		

Tabelle 3: Übersicht über die Sensitivität für Apoptoseinduktion auf HFF, SMC, AEC, HCAEC, HUVEC

Eine Expressionsänderung von >30% wird durch drei Pfeile dargestellt, 20 - 29% 2 Pfeile, 10 – 19% durch einen Pfeil. Eine Veränderung <10% wird durch waagerechte Pfeile dargestellt.

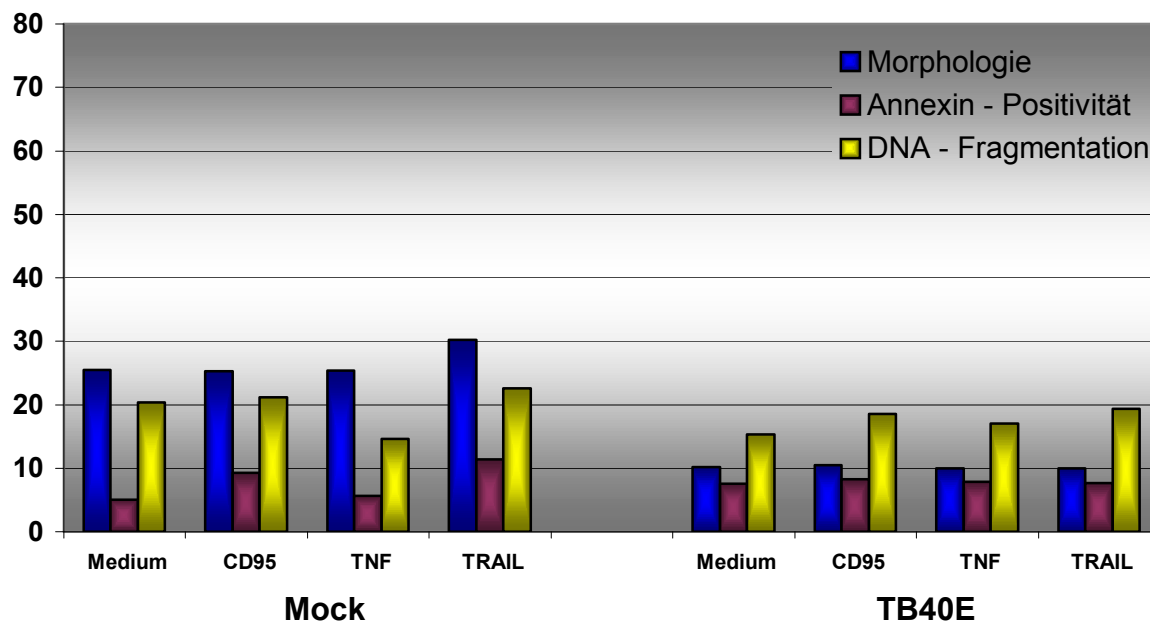


Abb. 25: Apoptosesensitivität von SMC nach Infektion mit HCMV in Abhängigkeit der Liganden 48h p.i.. Die Induktion der Apoptose erfolgte mit anti- CD95 IgG3 + Protein G, TNF (1000 U/ml) sowie TRAIL (100 ng/ml). Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenzintensitätsunterschiede.

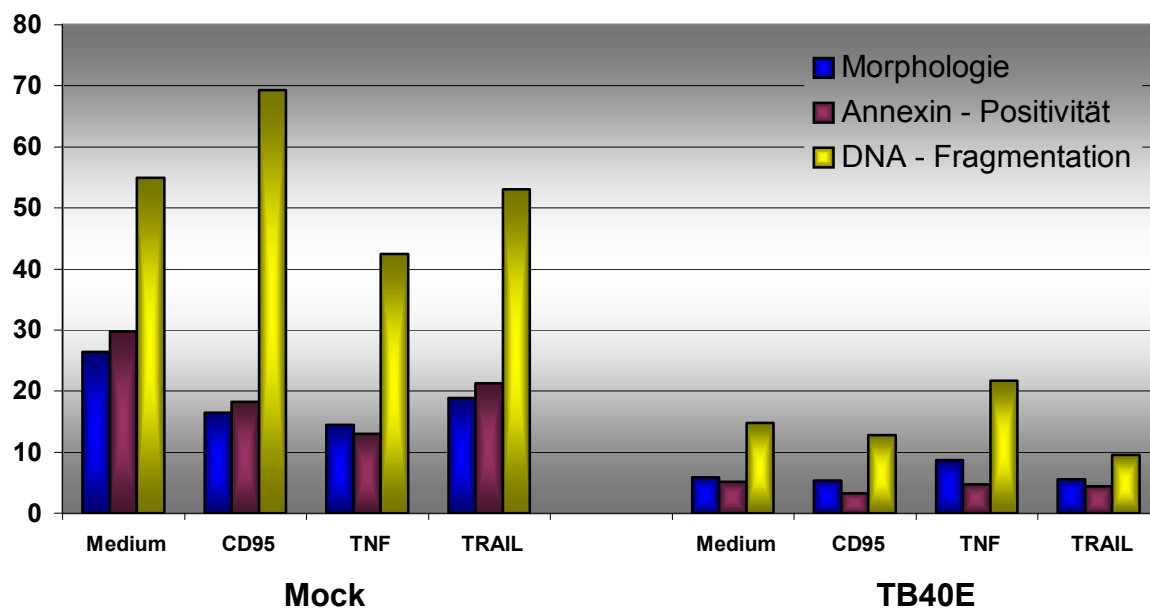


Abb. 26: Apoptosesensitivität von HUVEC nach Infektion mit HCMV in Abhängigkeit der Liganden 48h p.i.. Die Induktion der Apoptose erfolgte mit anti - CD95 IgG3 + Protein G, TNF (1000 U/ml) sowie TRAIL (100 ng/ml). Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenzintensitätsunterschiede.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Durchflußzytometrie die Veränderungen in der Expression Apoptose-induzierender Oberflächenrezeptoren auf verschiedenen Zellen nach HCMV-Infektion zu analysieren und funktionelle Veränderungen der Apoptose zu bestimmen.

Der in vivo-Modulation von Apoptosesignalwegen kann im Rahmen der Immunevasion eine wichtige Rolle für die Virusreplikation, Viruslatenz und Viruselimination zukommen. In vitro scheint die Verhinderung von vorzeitigem Zelltod in bestimmten Zelltypen (u.a. HUVEC) durch Eingriffe in die Apoptosesignalwege eine Voraussetzung für die funktionierende Virusreplikation zu sein, was auch in dieser Studie bestätigt wurde.

Die Korrelation der quantitativen Expression von Apoptoserezeptoren mit Apoptose-Sensitivität wird in der Literatur unterschiedlich dargestellt und diskutiert [36,50]. Gelegentlich, aber nicht immer war es möglich, eine Veränderung der Expression von Todesrezeptoren mit einer veränderten Funktion der rezeptorvermittelten Apoptosesignalwege zu korrelieren. Vermehrte Expression von Todesrezeptoren durch proinflammatorische Zytokine korrelierte mit erhöhter Apoptosesensitivität. Nach Infektion mit murinem CMV wurde eine Hochregulation von CD95 in hämatopoetischen Zellen beobachtet, was mit einem beschleunigten Zelltod nach Stimulation des CD95-abhängigen Signalweges einherging [22, 40]. Fibroblasten sind nach HCMV-Infektion sensitiviert für TRAIL-abhängigen Apoptose dies korreliert mit einer erhöhten TRAIL-Expression nach HCMV-Infektion. [56]. Im Gegensatz dazu scheint eine hohe Expression von Apoptoserezeptoren in Tumorzelllinien keine Voraussetzung für eine intakte Funktion von Apoptosesignalwegen zu sein. In manchen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass eine Resistenz für rezeptorabhängige Apoptose trotz hoher Expression von Todesrezeptoren bestehen kann. Im Unterschied dazu konnte aber auch gezeigt werden, dass es trotz verminderter Expression von Apoptoserezeptoren durch bestimmte Medikamente zur Apoptose kommt. [68]

In unseren Experimenten wurde nach HCMV-Infektion in HFF eine verminderte Expression von CD95 und TNF-R1 gezeigt, TNF-R2 wurde nur auf infizierten Zellen nachgewiesen, nicht jedoch auf nicht-infizierten HFF. Entgegen unseren

Erwartungen war die veränderte Rezeptorexpression nach HCMV-Infektion in HFF nicht mit einer Veränderung der rezeptorabhängigen–Apoptosesignalwege verbunden. Wir konnten zeigen, dass

- die rezeptorabhängige Apoptose von verschiedenen HCMV-Stämmen unterschiedlich moduliert wurde. Nach Infektion mit stark fibroblastenadaptierten Laborstämmen (AD169, Town, TB40F) war die Apoptoseempfindlichkeit nach Stimulation mit apoptoseinduzierenden Liganden erhöht. Der Apoptose-resistente Phänotyp von HFF war dagegen nach Infektion mit Wildvirusähnlichen Isolaten (TB40E, Toledo) unverändert resistent.
- eine Sensitivierung für Apoptose durch Stimulation mit allen untersuchten Liganden nachweisbar war.
- die Empfindlichkeit der rezeptorabhängigen Apoptose nach Infektion mit fibroblastenadaptierten Isolaten trotz verminderter Expression bestimmter Apoptoserezeptoren verstärkt sein konnte.

Aus diesem Grund muss angenommen werden, dass intrazelluläre Veränderungen von Apoptosesignalwegen und weniger die veränderte Expression von Oberflächenrezeptoren für die veränderte Sensitivität HCMV-infizierter HFF entscheidend sind [41]. Die unterschiedliche Apoptosemodulation nach Infektion mit fibroblastenadaptierten oder wildvirusähnlichen Isolaten kann durch stammspezifische Mutationen viral kodierter Apoptoseinhibitoren (UL36, UL37) bedingt sein, eine Genotypisierung erfolgte im Rahmen dieser Studie nicht. Andererseits konnten auch Veränderungen zellulärer Apoptoseinhibitoren nach HCMV-Infektion nachgewiesen werden [41].

Stammspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit für Apoptose konnten von einer anderen Forschungsgruppe indirekt bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Zielzellen, die mit HCMV-Laborstämmen infiziert worden waren, sehr gut durch NK-Zellen eliminiert werden konnten, jedoch nicht nach Infektion mit klinischen HCMV-Isolaten. [7] Bisher ist unklar, ob HCMV-Stämme mit verstärkter Apoptose-Empfindlichkeit durch Selektion natürlich vorkommender HCMV-Varianten während der Fibroblastenadaptation entstehen oder durch Neumutationen in der Kultur.

In der Kultivierung von HUVEC beobachteten wir regelmäßig den Untergang konfluenter Zellen durch Apoptose, wenn die Zellen nicht rechtzeitig expandiert

wurden. Wir wählten dieses Zellmodell, um den Einfluss der HCMV-Infektion auf die rezeptorunabhängige Apoptosesignalwege zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine deutliche Suppression der Apoptose von HUVEC durch die Infektion mit HCMV. Aufgrund der Erkenntnisse in diesem Zellmodell kann angenommen werden, dass die Suppression von Apoptose durch HCMV das Überleben der Wirtszelle (HUVEC) während der HCMV-Replikation sicherstellt und einen entscheidenden Faktor für die ausreichende virale Replikation in bestimmten Wirtszellen darstellt. [24]

Alle untersuchten HCMV-Stämme führten zur deutlichen Downregulation von CD95 und TNF-R1. TNF-R2 war nur in HCMV-infizierten HFF nachweisbar. Im Gegensatz zur Modulation der Apoptoseempfindlichkeit waren für die Modulation von Apoptose vermittelnden Rezeptoren keine Unterschiede zwischen HCMV-Varianten nachweisbar. Es muss davon ausgegangen werden, dass dieser Mechanismus bei der Adaptation von HCMV in Fibroblasten nicht verändert wird. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die fibroblastenadaptierten Laborstämme (AD169, Towne, TB40F) bei ihrer Adaptation in Zellkultur Immun – escape – Mechanismen nicht mehr als Selektionsvorteil wirken. Der Verlust der Apoptosehemmung bei Fibroblasten adaptierten Laborstämmen kann durch diese Hypothese erklärt werden. Eine erhöhte Apoptoseempfindlichkeit ist für die Replikation im Wirtsorganismus nicht sinnvoll. Dieser ausschließlich in fibroblastenadaptierten Laborstämmen nachweisbare Phänotyp kann auch für die Attenuierung durch Zellkulturpassage mit verantwortlich sein. Die verminderte Expression von CD95 und TNF-R2 ist eine mögliche Strategie zur Immunevasion, die jedoch funktionell von untergeordneter Bedeutung ist. Anhand der hier vorliegenden Daten können nur andere, z.B. intrazelluläre Mechanismen dafür verantwortlich sein, die bislang noch nicht abschließend geklärt sind.

Aus dieser Arbeit leiten sich neue Fragestellungen ab, die in weiterführenden Studien untersucht werden sollten.

HCMV zeigt Latenz in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers [3, 39]. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Attenuierungsvorgänge, vergleichbar denen in den verschiedenen Zellsystemen, auch in den infizierten Zellen des menschlichen Körpers unterschiedlich ablaufen.

So kann es in manchen Zellen zu einer Attenuierung des Virus kommen, welche durch die dann erhöhte Apoptosesensitivität leichter durch das Immunsystem beseitigt werden. Auf der anderen Seite kann das Virus in Zellen mit geringer ausgeprägten Abwehrmechanismen einen wirkungsvollen Schutz gegen den Angriff des Immunsystems aufbauen, um genügend Zeit für die virale Replikation zu gewinnen (vgl. HUVEC). Weitere Studien sollen klären, ob die beschriebenen Organmanifestationen dadurch zu erklären sind, dass unterschiedliche Zellsysteme unterschiedliche Veränderungen am Virus verursachen. Es ist bisher noch unklar, ob nach der Primärinfektion und der darauf folgenden Latenzbildung ein Pathogenitätsverlust durch Zellpassage auch in humanen Zellsystemen auftritt. Es ist zu erforschen, inwieweit die hier gefundenen Veränderungen auch in vivo so auftreten.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlicher Unterschied der Apoptose-Empfindlichkeit nach Infektion mit verschiedenen HCMV-Stämmen gesehen werden. In weiteren Studien wäre über eine Apoptose Phänotypisierung der Isolate bei infizierten Patienten zu klären, inwieweit die Modulation der Apoptose durch unterschiedliche Virusvarianten für die Schwere der HCMV - Erkrankung relevant ist. Die erhöhte Apoptoseempfindlichkeit nach Infektion mit fibroblastenadaptierten Laborstämmen ist möglicherweise ein Mechanismus der Attenuierung. Daraus folgt, dass eine HCMV-Infektion mit einem Laborstamm (AD169) im Vergleich zur Infektion mit Wildvirus oder Wildvirus-ähnlicheren HCMV Stämmen (TB40E, Toledo) von verminderter Virulenz ist. In weiteren Studien sollten stammabhängige Unterschiede HCMV-kodierter Apoptoseinhibitoren auch in Patientenisolaten bestimmt und auf unterschiedliche Pathogenität untersucht werden.

Die protrahierte in vitro-Passage in Zellkultur führt häufig zur Abnahme der Pathogenität in vivo. Dies ist für die Generierung von Impfviren bereits bekannt. Mit Einführung rekombinanter Techniken zur gezielten Attenuierung von HCMV – Varianten ist es möglich, virale Gene der Apoptosehemmung zu eliminieren (KO-Mutationen). Die Frage, ob dieser Mechanismus auch für die Entwicklung eines Impfstoffes für HCMV benutzt werden kann, ist durch weitere Studien zu klären.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe durchflußzytometrischer Methoden die Veränderungen in der Expression Apoptose-spezifischer Oberflächenrezeptoren (CD95 [apoptosevermittelnder Oberflächenrezeptor], TNF-Rezeptor-1 [Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1], TNF-Rezeptor-2 [Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2]) nach Infektion mit humanem Zytomegalievirus (HCMV) auf verschiedenen Zellen zu analysieren und funktionelle Veränderungen in der Apoptose zu bestimmen.

Die Analyse der Expression von Oberflächenrezeptoren erfolgte 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Infektion (p.i.) in jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Es konnte gezeigt werden, dass nach HCMV-Infektion eine verminderte Expression von CD95 und TNF-Rezeptor 1 auftritt. TNF-Rezeptor 2 wurde nur auf infizierten Zellen exprimiert. Bei der HCMV-Infektion in glatten Muskelzellen (SMC) zeigte sich eine verminderte Expression von CD95, sowie eine leicht gesteigerte Expression von TNF-Rezeptor 1. Bei Endothelzellen (artery endothelial cells [AEC], human coronar artery endothelial cells [HCAEC], human umbilical vein endothelial cells [HUVEC]) führte die HCMV-Infektion eher zu einer verstärkten Expression von CD95, während die Expression von TNF-Rezeptor 1 nicht beeinflusst wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die funktionellen Veränderungen durch HCMV-Infektion untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei bei den Veränderungen in HFF (humane Vorhautfibroblasten):

Wir konnten zeigen, dass die rezeptorabhängige Apoptose von verschiedenen HCMV-Stämmen unterschiedlich moduliert wurde. Nach Infektion mit stark fibroblastenadaptierten Laborstämmen (AD169, Town, TB40F) war die Apoptoseempfindlichkeit nach Stimulation mit apoptoseinduzierenden Liganden erhöht. Der apoptoseresistente Phänotyp von HFF war dagegen nach Infektion mit wildvirusähnlichen Isolaten (TB40E, Toledo) unverändert resistent.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Sensitivierung für Apoptose durch Stimulation mit allen untersuchten Liganden nachweisbar war. Erstaunlicherweise war die Empfindlichkeit der rezeptorabhängigen Apoptose nach Infektion mit fibroblastenadaptierten Isolaten trotz verminderter Expression bestimmter Apoptoserezeptoren verstärkt.

Aus diesen Ergebnissen muss geschlossen werden, dass intrazelluläre Veränderungen von Apoptosesignalwegen und weniger die veränderte Expression von Oberflächenrezeptoren für die veränderte Sensitivität HCMV-infizierter HFF entscheidend sind. Es kann vermutet werden, dass die Unterschiede zwischen fibroblastenadaptierten und wildvirusähnlichen Stämmen durch Mutationen viraler Apoptoseinhibitoren ausgelöst werden. Bei HUVEC konnte in der Zellkultur spontane Apoptose auch ohne Infektion gezeigt werden. In diesem Zellmodell wurde der Einfluss der HCMV-Infektion auf rezeptorunabhängige Apoptosesignalwege untersucht. Es fand sich eine verminderte Apoptose nach HCMV-Infektion. Aufgrund der Erkenntnisse in diesem Zellmodell kann angenommen werden, dass die Suppression von Apoptose durch HCMV das Überleben der Wirtszelle (HUVEC) während der HCMV-Replikation sicherstellt und einen entscheidenden Faktor für die ausreichende virale Replikation in bestimmten Wirtszellen darstellt.

7 Literaturverzeichnis

1. Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S: Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. USA: Proc Natl Acad Sci 90: 1756–1760 (1993)
2. Baker SJ, Reddy E: Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. Oncogene 12: 1–9 (1996)
3. Baltesen M, Messerle M, Reddehase MJ: Lungs are a major organ site of cytomegalovirus latency and recurrence. J Virol 67: 5360–5366 (1993)
4. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W: Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. Cell 73: 431–445 (1993)
5. Barclay AE, Franklin KJ, Prichard ML: The fetal circulation and cardiovascular system and the changes they undergo at birth. Blackwell Scientific Publications, Oxford, S. 242–275 (1944)
6. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D: Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell 85: 803–815 (1996)
7. Cerboni C, Mousavi-Jazi M, Linde A, Söderström K, Brytting M, Wahren B, Kärre K, and Carbone E: Human cytomegalovirus strain-dependent changes in NK cell recognition of infected fibroblasts. J Immunol 164: 4775–4782 (2000)
8. Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM: Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. J Biol Chem 271: 4573–4576 (1996)
9. Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM: FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor induced apoptosis. J Biol Chem 271: 4964–4965 (1996)
10. Chu JL, Drappa J, Parnassa A, Elkon KB: The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon. J Exp Med 178: 723–730 (1993)

11. Clarke PGH, Clarke S: Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol* 193: 81-99 (1996)
12. Combadiere B, Reis e Sousa C, Trageser C, X Zheng L, Kim CR, Lenardo MJ: Differential TCR signaling regulates apoptosis and immunopathology during antigen responses in vivo. *Immunity* 9: 305–313 (1998)
13. Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P, Krammer PH: Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 149: 3166–3173 (1992)
14. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH: Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373: 438–441 (1995)
15. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43–50 (1998)
16. Farrell HE, Vally H, Lynch DM, Fleming P, Shellam GR, Scalzo AA, and Davis-Poynter NJ: Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature* 386: 510-513 (1997)
17. Fowlkes BJ, Schwartz RH, Pardoll DM: Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4+8+ precursor stage. *Nature* 334: 620–623 (1988)
18. Glucksmann A: Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26: 59–81 (1951)
19. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA: Fas-ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270: 1189-1192 (1995)
20. Griffith BP, McCormick SR, Fong CK, Lavallee JT, Lucia HL, Goff E: The placenta as a site of cytomegalovirus infection in guinea pigs. *J Virol* 55: 402-409 (1985)
21. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J: Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363–1366 (1996)
22. Hengel H, Esslinger C, Pool J, Goulmy E, and Koszinowski UH: Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *J Gen Virol* 76: 2987-2997 (1995)

23. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334–336 (1990)
24. Hu MC, Hsu MT: Adenovirus E1B 19K protein is required for efficient DNA replication in U937 cells. *Virology* 227: 295–304 (1997)
25. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233–243 (1991)
26. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC: Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361: 365–369 (1993)
27. Jenkinson EJ, Kingston R, Smith KA, William GT, Owen JJ: Antigen induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the T cell repertoire. *Eur J Immunol* 19: 2175–2177 (1989)
28. Jacobson MA, Crowe S, Levy J, Aweeka F, Gambertoglio J, McManus N, Mills J: Effect of Foscarnet therapy on infection with human immunodeficiency virus in patients with AIDS. *J Infect Dis* 158: 862–865 (1988)
29. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H: Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 182: 1777–1783 (1995)
30. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer* 26: 239–257 (1972)
31. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579–5588 (1995)
32. Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC: Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53: 4704–4714 (1993)

33. Leithäuser F, Dhein J, Mechtersheimer G, Koretz K, Brüderlein S, Henne C, Schmidt A, Debatin KM, Krammer PH, Möller P: Constitutive and induced expression of Apo-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 69: 415-429 (1993)
34. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89: 175–184 (1997)
35. Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X: Activation of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or Nuclease). *J Biol Chem* 274: 13836–13840 (1999)
36. MacCormac LP, Grundy JE: Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (FcgammaR) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular FcgammaRs. *J Infect Dis* 174: 1154–1161 (1996)
37. Mariani SM, Matiba B, Baumler C, Krammer PH: Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol* 25: 2303–2307 (1995)
38. Matsuzawa A, Moriyama T, Kaneko T, Tanaka M, Kimura M, Ikeda H, Katagiri T: A new allele of the *lpr* locus, *lprcg*, that complements the *gld* gene in induction of lymphadenopathy in the mouse. *J Exp Med* 171: 519–531 (1990)
39. Mocarski ES Jr, Abenes GB, Manning WC, Sambucetti LC, Cherrington JM: Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Curr Top Microbiol Immunol* 154: 47-74 (1990)
40. Mori T, Ando K, Tanaka K, Ikeda Y, Koga Y: Fas-mediated apoptosis of the hematopoietic progenitor cells in mice infected with murine cytomegalovirus. *Blood* 89: 3565–3573 (1997)
41. Müller von L, Mörk S, Fulda S, Debatin KM and Mertens T: HCMV Infection Enhances or Reduces Susceptibility to Apoptosis depending on Cell Type and Virus Strain used. *J Virol* (2003) (zur Publikation angenommen)
42. Nossal GJ: Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76: 229–239 (1994)
43. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F: The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184: 1075–1082 (1996)

44. Oehm A, Behrmann I, Falk, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC: Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267: 10709–10715 (1992)
45. Osmond DG: The turnover of B-cell populations. *Immunol Today* 14: 34–37 (1993)
46. Pass RF, Huang ES, Alford CA, Reynolds DW, Stagno S: Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections in women and their infants. *N Engl J Med* 303: 958-962 (1980)
47. Peckham CS, Chin KS, Coleman JC, Henderson K, Hurley R, Preece PM: Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. *Lancet* 18: 1352-1355 (1983)
48. Peter ME, Kischkel FC, Scheuerpflug CG, Medema JP, Debatin KM, Krammer PH: Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur J Immunol* 27: 1207–1212 (1997)
50. Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel FC, Krammer PH: The Death Receptors. In *Apoptosis, problems and diseases*. Springer, Heidelberg, S. 25–63 (1998)
51. Reyburn H, Mandelboim O, Valés-Gómez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL: The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386: 514-517 (1997)
52. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P: Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med* 177: 195–200 (1993)
53. Sakahira H, Enari M, Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99 (1998)
54. Sarov B, Naggan L, Rosenzweig R, Katz S, Haikin H, Sarov I: Prevalence of antibodies to human cytomegalovirus in urban, kibbutz, and Bedouin children in southern Israel. *J Med Virol* 10: 195-201 (1982)
55. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG: The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76: 959–962 (1994)

-
56. Sträter J, Walczak H, Pukrop T, von Müller L, Hasel C, Kornmann M, Mertens T, Möller P: TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology* 122: 659-666 (2002)
 57. Stagno S, Whitley RJ: Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 313: 1270-1274 (1985)
 58. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR: Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2: 1361–1366 (1996)
 59. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169–1178 (1993)
 60. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S: Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76: 969–976 (1994)
 61. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S: Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 6: 1567–1574 (1994)
 62. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S: Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 14: 1129–1135 (1995)
 63. Tanaka S, Saito K, Reed JC: Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem* 268: 10920–10926 (1993)
 64. Tschopp J, Irmeler M, Thome M. Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10: 552-558 (1998)
 65. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM: Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440–1443 (1985)
 66. Ulbrecht M, Martinozzi S, Grzeschik M, Hengel H, Ellwart JW, Pla M, Weiss EH: Cutting edge: the human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J Immunol* 164: 5019-5022 (2000)

67. Vaux DL, Cory S, Adams JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c- myc to immortalize pre B cells. Nature 335: 440–442 (1988)
68. von Reyher U, Sträter J, Kittstein W, Gschwendt M, Krammer PH, Möller P: Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. Cancer Res 58: 526-534 (1998)
69. Vogt C: Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricians). Jent & Gassmann, Solothurn, S. 18-35 (1842)
70. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. Nature 356: 314–317 (1992)

Danksagungen

- Prof. Dr. Thomas Mertens, Abteilung Virologie der Universität Ulm für die Ermöglichung der Arbeit und die wertvollen Anregungen während der Experimente.
- Dr. Lutz von Müller, Abteilung Virologie der Universität Ulm für die ausgezeichnete Betreuung, die vielen Anregungen und Ermutigungen an schlechten Tagen und dafür ein Freund zu sein.
- Meinen Eltern, die trotz aller Widrigkeiten immer an mich und auch an meine Doktorarbeit geglaubt haben.
- Frau Stefanie Wiedmann, die meinem Leben den Sinn wiedergegeben hat, den ich so lange vermisst habe.
- Frau Katharina Kulus für die mehrfache Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes.
- Herrn Marco Höpfner für die Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes.
- Viele Labor-Mitarbeiter standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, besonders wertvoll war für mich die Hilfe von Frau Anke Lüske und Frau Dr. Barbara Reinhard.
- Frau Ingrid Bennet, die gute Seele und Chefsekretärin der Abteilung Virologie, ohne die Vieles viel schwieriger gewesen wäre.

Lebenslauf

Name	Sven Mörk
Geburtsdatum	1. November 1975
Geburtsort	Leonberg
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Anschrift	Hirschweg 8 73061 Ebersbach an der Fils
Schule	1982 – 1986 Grund- u. Hauptschule Höfingen 1986 – 1995 Johannes – Kepler – Gymnasium Leonberg Abitur 1995
Studium	Ab Oktober 1995 Studium der Humanmedizin Universität Ulm Frühjahr 1998 Medizinische Vorprüfung Frühjahr 1999 1. Staatsexamen Frühjahr 2001 2. Staatsexamen Frühjahr 2002 3. Staatsexamen
Ärztliche Tätigkeit	01. Juni 2002 – 30. November 2003 Arzt im Praktikum (AiP) Chirurgische Klinik Städtisches Klinikum Pforzheim 01. Dezember 2003 – 31. Mai 2004 Assistenzarzt Chirurgische Klinik Feuerbach Klinikum Stuttgart Seit 01. Juni 2004 Assistenzarzt Abteilung für Chirurgie Kreiskrankenhaus Kirchheim unter Teck