

Aus dem Institut für Infektionsmedizin
Direktor: Prof. Dr. Helmut Fickenscher
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Der antivirale Effekt des T-Zell-Zytokins
Interleukin-26 auf die Infektion mit
dem humanen Cytomegalovirus**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Michael Klages
aus Hannover

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Fickenscher

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Sabine Adam

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 29.06.2016

gez.: Prof. Dr. Rainer Podschun

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
3.1	Die Interleukin-10-Zytokin-Familie	3
3.1.1	Interleukin-10.....	4
3.1.2	Interleukin-19.....	5
3.1.3	Interleukin-20.....	6
3.1.4	Interleukin-22.....	6
3.1.5	Interleukin-24.....	8
3.1.6	Interleukin-28A, Interleukin-28B und Interleukin-29	8
3.1.7	Interleukin-26.....	10
3.2	Humanes Cytomegalovirus	13
3.2.1	Epidemiologie	13
3.2.2	Übertragung.....	14
3.2.3	Klinik	15
3.2.4	Diagnostik	16
3.2.5	Aufbau und Replikation.....	16
3.2.6	Pathogenese und Viruslatenz.....	17
3.2.7	Therapie	19
3.3	Zielsetzung.....	19
4	Material und Methoden	20
4.1	Material.....	20
4.1.1	Eukaryonte Zelllinien.....	20
4.1.2	Zellkulturmedien und Zellkulturreagenzien	20
4.1.3	Oligonukleotide und Sonden.....	20
4.1.4	Enzyme.....	21
4.1.5	Restriktionsendonukleasen	22
4.1.6	Reagenzien.....	22
4.1.7	Antikörper.....	22
4.1.8	Puffer und Lösungen.....	23

4.2	Methoden	23
4.2.1	Zellkultur.....	23
4.2.2	Inhibitionsexperimente durch polyklonales Anti-IL-26-Serum	24
4.2.3	RNA-Präparation.....	25
4.2.4	Reverse Transkription.....	25
4.2.5	Durchflusszytometrie.....	26
4.2.6	Virustitration.....	26
4.2.7	Enzymimmuntest für Interferon- β	27
4.2.8	Mikrotiterplatten-Fluorimetrie	27
4.2.9	Immunblot	28
4.2.10	Polymerase-Kettenreaktion	28
4.2.11	Quantitative-PCR	29
4.3	Statistische Auswertung	32
5	Ergebnisse.....	33
5.1	Der Einfluss von IL-26 auf die Virusinfektion	33
5.2	Abhängigkeit des IL-26-Effektes von der Infektionsmultiplizität.....	37
5.3	Vorinkubation mit IL-26	40
5.4	Vorinkubation mit Anti-IL-26-Serum	44
5.5	Einfluss von IL-26 auf die Infektion mit dem Herpes-simplex-Virus Typ 1	45
5.6	Expression des IL-26-Rezeptors in primären Fibroblasten	48
5.7	Expression antiviraler Gene in Abhängigkeit von IL-26	50
5.8	Bestimmung der IFN- β 1-Konzentration im Zellkulturüberstand.....	54
5.9	Nachweis von hCMV-Proteinen im Immunblot.....	55
6	Diskussion.....	58
6.1	Antiviraler Effekt von IL-26	58
6.2	Unabhängigkeit des Effektes vom IL-26-Rezeptor.....	60
6.3	Virale Proteinexpression.....	63
6.4	Expression antiviraler Gene in Abhängigkeit von IL-26.....	64
6.5	Klinische Bedeutung von Interleukin-26.....	66
7	Abkürzungsverzeichnis	70
8	Literaturverzeichnis	72
9	Danksagung.....	88
10	Lebenslauf	89
11	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.....	90
12	Erklärung.....	91

1 Zusammenfassung

Das kationische Zytokin Interleukin-26 (IL-26) ist aufgrund seiner Struktur und seiner Homologie zu IL-10 ein Mitglied der IL-10-Zytokin-Familie. IL-26 wird vorwiegend von T-Zellen, Subtypen Natürlicher Killerzellen, Monozyten sowie Fibroblasten- und Makrophagen-ähnlichen Synoviozyten exprimiert. Die Signaltransduktion erfolgt im Wesentlichen über einen heterodimeren Rezeptor, der aus der Liganden-bindenden Rezeptorkette IL-20R1 und der akzessorischen Kette IL-10R2 besteht. Der Rezeptor wird hauptsächlich von epithelialen Zellen gebildet. In Zellkultur konnten für IL-26 sowohl Replikations-fördernde als auch antivirale Effekte auf verschiedene Modellviren gezeigt werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, den antiviralen Effekt von IL-26 und dessen Wirkmechanismen auf die Infektion mit dem humanen Cytomegalovirus (hCMV) in Zellkulturen primärer Fibroblasten zu untersuchen.

Nach Vorbehandlung permissiver Fibroblasten mit IL-26 und hCMV-Infektion wurden gegenüber den Kontrollen Konzentrations-abhängig signifikant weniger Zellen infiziert. Die Auswertung erfolgte dabei durch Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und Virustitration. Dieser Effekt war abhängig von dem Verhältnis zwischen Virustiter und der Zahl der Zielzellen. Bei niedrigem Virustiter war der Anteil virusinfizierter Zellen in Gegenwart von IL-26 stärker vermindert. Erfolgte zuerst die Virus-Infektion und dann die IL-26-Inkubation waren signifikant mehr Zellen infiziert als nach Vorinkubation mit IL-26. Dies weist auf eine Bedeutung von IL-26 in der Frühphase der Virusinfektion hin. Der beobachtete Effekt war spezifisch für hCMV. Die Infektion mit Herpes-simplex-Virus Typ 1 wurde durch IL-26 nicht beeinflusst. Der antivirale Effekt von IL-26 war unabhängig von IL-26R. Für primäre Fibroblasten konnte zwar eine geringe RNA-Expression beider Rezeptorketten nachgewiesen werden, jedoch unterblieb nach IL-26-Behandlung der Fibroblasten die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren, zu der es nach IL-26R-Aktivierung kommt. Bezüglich der Expression viraler Proteine konnte ein Einfluss von IL-26 auf spezifische Replikationsphasen im Immunblot nicht gezeigt werden. Des Weiteren wurde die zelluläre Genexpression hCMV-infizierter Fibroblasten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass IL-26 in virusinfizierten Zellen zu einer Induktion der antiviral wirksamen Gene für Interferon- β 1 (IFN- β 1) und für IFN-abhängige Faktoren führt. In nicht-infizierten Zellen konnte dagegen eine Steigerung der Genexpression durch IL-26 nicht nachgewiesen werden. Entsprechend konnten erhöhte IFN- β 1-Konzentrationen im Kulturüberstand IL-26-behandelter, virusinfizierter Fibroblasten gemessen werden.

Das Zytokin IL-26 hemmt also IL-26R-unabhängig die hCMV-Infektion permissiver Fibroblasten. IL-26 erscheint wesentlich für die Frühphase der Virusinfektion und dürfte durch seine stark basische Ladung die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Virus und der Zielzelle beeinflussen. Außerdem steigerte IL-26 die Expression von IFN- β 1 und IFN-responsiver Gene und dürfte somit die antiviralen zellulären Funktionen unterstützen.

2 Summary

The cationic cytokine interleukin-26 (IL-26) is a member of the interleukin-10-cytokine-family due to its structure and homology to IL-10. IL-26 is mainly expressed by T-cells, specific subtypes of natural killer cells, monocytes as well as fibroblast- and macrophage-like synoviocytes. The signal transduction is mainly mediated through a heterodimeric receptor consisting of the ligand-binding chain IL-20R1 and the accessory chain IL-10R2. The receptor is expressed by epithelial cells. In cell culture, IL-26 showed both replication-enhancing and antiviral effects on different model viruses. The aim of this project was to investigate the antiviral effect of IL-26 and its mechanism on the infection by human cytomegalovirus (hCMV) in cell cultures of primary fibroblasts.

After pretreatment of the fibroblasts with IL-26 and the following hCMV infection, significantly less cells were infected in comparison to the controls in a concentration-dependent way. The measurements were performed with fluorescence microscopy, flow cytometry and virus titration. The effect depended on the ratio between virus titers and cell numbers. Upon low virus titers, the proportion of virus-infected cells was more decreased in presence of IL-26. If the cells were first infected with the virus and then incubated with IL-26, significantly more cells were infected than after preincubation with IL-26. This indicates a relevance of IL-26 for the early phase of virus infection. The observed effect of IL-26 was specific for hCMV. The infection with herpes-simplex-virus type 1 was not affected by IL-26. The antiviral effect of IL-26 was independent of IL-26R. In primary fibroblasts, a low-level RNA expression of both receptor chains could be shown. However, the phosphorylation of the transcription factors was not observed which occurs typically after IL-26 treatment. Concerning the expression of virus proteins, an influence of IL-26 on specific replication phases could not be demonstrated by immunoblot. Furthermore, the cellular gene expression of hCMV-infected fibroblasts was examined. An induction of the antiviral genes for interferon- β 1 (IFN- β 1) and for IFN-dependent factors was detectable in virus-infected cells which were pretreated with IL-26. In non-infected cells, an increase of gene expression by IL-26 could not be observed. Correspondingly, increased IFN- β 1 concentrations were detectable in the culture supernatant of IL-26-treated and virus-infected cells.

Thus, the cytokine IL-26 inhibits hCMV infection of permissive fibroblasts independently of IL-26R. IL-26 seems relevant for the early phase of virus infection and might influence the electrostatic interactions between the virus and the target cells due to its highly basic charges. In addition, IL-26 also induced the expression of IFN- β 1 and IFN-responsive-genes and, hence, might support antiviral cellular functions.

3 Einleitung

3.1 Die Interleukin-10-Zytokin-Familie

Zytokine beeinflussen über spezifische Rezeptoren Zellinteraktionen und bewirken eine Vielzahl verschiedener Effekte. Eine Untergruppe der Zytokine bilden die Interleukine (IL). Diese zeichnen sich meist durch kurze Halbwertszeiten aus und sind bereits in niedrigen Konzentrationen biologisch aktiv.

Die Mitglieder der IL-10-Zytokin-Familie gehören zur Gruppe der Typ-II-Zytokine, welche sich über den spezifischen Aufbau ihrer Rezeptoren definieren (Fickenscher et al., 2002). Zu den Typ-II-Zytokinen wird auch die Gruppe der Interferone (IFN) gezählt (Bazan, 1990). Neben dem Prototyp IL-10 gehören die Zytokine IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26 und die λ -IFNe IL-28A, IL-28B und IL-29 zur IL-10-Zytokin-Familie. Die Gene für diese Zytokine sind an wenigen Loci im menschlichen Genom jeweils in unmittelbarer Nachbarschaft lokalisiert. Sie haben außerdem eine verwandte Primär- und Sekundärstruktur und verwenden ähnliche Rezeptorkomplexe. Die Gene für IL-10, IL-19, IL-20 und IL-24 sind zusammen auf Chromosom 1 in der Region 1q32 und die Gene für IL-22 und IL-26 auf Chromosom 12 in der Region 12q15 lokalisiert (Dumoutier et al., 2000b; Knappe et al., 2000). Die Gene haben den gleichen strukturellen Aufbau und bestehen im Falle von IL-10, IL-19, IL-20, IL-22 oder IL-26 aus je fünf und bei IL-24 aus sechs kodierenden Exons (Zdanov, 2010). Zwischen den Mitgliedern der IL-10-Familie besteht eine Homologie von 9 - 40 % in der Aminosäuresequenz. Trotz der teilweise niedrigen Identität haben alle Mitglieder eine ähnliche Sekundärstruktur (Zdanov, 2010). Diese besteht aus sechs α -Helices, die durch Disulfidbrücken untereinander verbunden sind (Walter & Nagabhushan, 1995; Zdanov et al., 1995; Josephson et al., 2001; Nagem et al., 2002; Chang et al., 2003; Xu et al., 2005; Jones et al., 2008).

Die Signaltransduktion der IL-10-Familien-Mitglieder erfolgt über heterodimere Rezeptoren. Dabei werden einzelne Rezeptorketten jeweils von mehreren Zytokinen verwendet. Beispielsweise wird die Rezeptorkette IL-10R2 von IL-22, IL-26, IL-28A, IL-28B und IL-29 genutzt (Sabat et al., 2010). Die Bindung der Zytokine an ihren Rezeptor führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *signal transducers and activators of transcription* (STAT). Dabei wird von allen IL-10-Familien-Mitgliedern vorwiegend der Transkriptionsfaktor STAT-3 aktiviert. In einigen Zelllinien kommt es aber auch zu einer Aktivierung von STAT-1 und STAT-5 (Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004; Tritsarlis et al., 2007).

3.1.1 Interleukin-10

IL-10, der Prototyp der IL-10-Zytokin-Familie, wurde initial als ein von murinen Th2-Zellen sezernierter inhibitorischer Faktor entdeckt, welcher die IFN- γ -Expression der Th1-Zellen hemmt (Fiorentino et al., 1989). IL-10 übt darüber hinaus eine Vielzahl weiterer inhibitorischer und stimulatorischer Effekte auf verschiedene Immunzellen aus und nimmt eine essentielle Rolle als Suppressor der körpereigenen Immunantwort ein und ist damit ein wichtiger Faktor für die Entwicklung einer immunologischen Toleranz.

Im Genom verschiedener DNA-Viren konnten virale Homologe des humanen IL-10 identifiziert werden, welche die Virusinfektion beeinflussen. Das IL-10-Homolog des γ_1 -Herpesvirus Epstein-Barr-Virus weist eine Identität der Aminosäuresequenz von 83 % zum humanen IL-10 auf (Hsu et al., 1990; Liu et al., 1997; Fickenscher et al., 2002). Auch das humane β -Herpesvirus Cytomegalovirus (hCMV) bildet ein IL-10-Homolog. Dieses hat jedoch mit einer Homologie von 23 % eine wesentlich niedrigere Sequenzidentität. Dennoch konnte gezeigt werden, dass das virale IL-10-Homolog an den IL-10R bindet und eine Signaltransduktion stattfindet (Kotenko et al., 2000).

Das humane IL-10 bildet Homodimere von ca. 35 kDa aus zwei nicht kovalent verbundenen Monomeren. Das IL-10-Homodimer hat zwei V-förmig orientierte Domänen, bestehend aus Helix A-D des einen und Helix E` und F` des anderen Monomers (Savan et al., 2009). Der IL-10R ist ein heterodimerer Rezeptor, der aus der Liganden-bindenden Rezeptorkette IL-10R1 und der akzessorischen Rezeptorkette IL-10R2 besteht (Lutfalla et al., 1993; Liu et al., 1994; Kotenko et al., 1997). Die Bindung von IL-10 an IL-10R1 verursacht konformationelle Änderungen, die zu einer Assoziation mit IL-10R2 führen. Über die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase Janus-Kinase 1 (JAK1) und Tyrosinkinase 2 (Tyk2) kommt es zur einer Phosphorylierung zweier spezifischer Tyrosinreste der intrazellulären Domäne von IL-10R1 und zur Anlagerung der Transkriptionsfaktoren STAT-1, STAT-3 und STAT-5, die ebenfalls phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. Die phosphorylierten STAT-Faktoren bilden Homodimere aus und werden in den Zellkern transloziert, wo sie mit hoher Affinität an Promotoren der IL-10-responsiven Gene binden (Finbloom & Winestock, 1995; Weber-Nordt et al., 1996; Wehinger et al., 1996).

Zu den durch IL-10 induzierbaren Genen zählen *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-1 und -3 (Ding et al., 2003). SOCS-1 ist ein Inhibitor der Signaltransduktion durch die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- γ (Alexander et al., 1999; Naka et al., 2001; Ding et al., 2003) und führt über die Inhibition von JAK1 zur negativen Rückkopplung und Begrenzung der Signaltransduktion (Yasukawa et al., 1999). Die Induktion von SOCS-3 führt zu einer Hemmung der Signaltransduktion durch IL-6 (Niemand et al., 2003).

IL-10 wird vorwiegend von Immunzellen gebildet. Dabei erfolgt die Produktion im Wesentlichen durch Monozyten, Makrophagen und verschiedene Subtypen von T-Zellen. Aber auch Dendritische Zellen, B-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen und Granulozyten exprimieren geringere Mengen des Zytokins. In den meisten Geweben konnte eine Expression von IL-10 nicht nachgewiesen werden (Moore et al., 2001; Sabat et al., 2010). Die wesentlichen Zielzellen von IL-10, welche den IL-10R exprimieren, sind hämatopoetische Zellen wie Monozyten, Dendritische Zellen, T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen (Moore et al., 2001; Wolk et al., 2002; Nagalakshmi et al., 2004a).

IL-10 bewirkt hauptsächlich eine Suppression von Entzündungsreaktionen. Die Antigenpräsentation über den *major histocompatibility complex* (MHC) Typ II durch Makrophagen und Dendritische Zellen wird reduziert (de Waal Malefyt et al., 1991b; Ding & Shevach, 1992; Enk et al., 1993; Macatonia et al., 1993; Péguet-Navarro et al., 1994). Außerdem wird die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-2, IL-6 und des *tumor necrosis factor α* (TNF- α) inhibiert (de Waal Malefyt et al., 1991a; Fiorentino et al., 1991). Des Weiteren wird die Synthese antiinflammatorischer Proteine wie dem IL-1R-Antagonisten, dem löslichen TNF- α -Rezeptor und von Gewebsinhibitoren der Matrixmetalloproteasen gefördert (Moore et al., 2001). Durch Inhibition der IFN- γ -Sekretion trägt IL-10 zur Differenzierung von Th2-Zellen bei (D'Andrea et al., 1993). Weitere Effekte sind die Aktivierung der Immunglobulinproduktion in B-Zellen (Rousset et al., 1992), die Proliferationsinduktion von Mastzellen (Thompson-Snipes et al., 1991) und die Erhöhung der Zytotoxizität von NK-Zellen (Cai et al., 1999).

3.1.2 Interleukin-19

Das Zytokin IL-19 konnte aufgrund seiner Homologie zu IL-10 bei der Durchsichtung von Gendatenbanken identifiziert werden (Gallagher et al., 2000). Zusammen mit IL-20 und IL-24 nutzt IL-19 einen Rezeptor, der aus den Ketten IL-20R1 und IL-20R2 besteht und auch als Typ-I-IL-20R bezeichnet wird (Dumoutier et al., 2001a; Parrish-Novak et al., 2002). IL-19 wird vor allem von Monozyten, Makrophagen und zu einem geringeren Teil auch B-Zellen gebildet (Gallagher et al., 2000; Wolk et al., 2002). Allerdings konnte für die Zytokine IL-19, IL-20 und IL-24 auch eine Expression in aktivierten somatischen Zellen wie beispielsweise Keratinozyten bestätigt werden (Hunt et al., 2006; Kunz et al., 2006; Holland et al., 2009; Tohyama et al., 2009; Wolk et al., 2009). IL-20R wird in signifikantem Ausmaß in der Haut, der Lunge, den Genitalorganen und verschiedenen Drüsen gebildet (Parrish-Novak et al., 2002; Wolk et al., 2004; Kunz et al., 2006).

Bislang existieren nur wenige Untersuchungen zu den biologischen Effekten von IL-19. Monozyten werden durch die Behandlung mit IL-19 zur Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α stimuliert. Außerdem führt IL-19 zu einer Apoptoseinduktion muriner

Monozyten und zu der vermehrten Bildung radikaler Sauerstoffspezies (Liao et al., 2002). Im Serum von Patienten mit Asthma bronchiale konnte gegenüber gesunden Probanden eine erhöhte IL-19-Konzentration gemessen werden. Eine Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung ist möglich (Liao et al., 2004).

3.1.3 Interleukin-20

IL-20 wurde ebenfalls unter Verwendung spezieller Algorithmen bei der Durchsichtung von Gendatenbanken entdeckt (Blumberg et al., 2001). Die Signaltransduktion erfolgt über den Typ-I-IL-20R, der aus den Ketten IL-20R1 und IL-20R2 besteht. Die Signaltransduktion ist aber auch über den Typ-II-IL-20R möglich, der aus IL-22R und IL-20R2 zusammengesetzt ist (Dumoutier et al., 2001a; Parrish-Novak et al., 2002). IL-20 wird von aktivierten Monozyten, Gliazellen, Keratinozyten und reifenden Dendritischen Zellen gebildet (Blumberg et al., 2001; Wolk et al., 2002 und 2008; Hosoi et al., 2004). Die Haut scheint aufgrund der starken Expression des Rezeptors das Hauptzielorgan von IL-20 zu sein (Wolk et al., 2004; Kunz et al., 2006). Weiter konnte gezeigt werden, dass IL-20-transgene Mäuse verschiedene Hautveränderungen, wie eine Verdickung der Epidermis, eine Hyperkeratose und eine Verdichtung des Stratum corneum, aufwiesen, welche neonatal zum Tode führten (Blumberg et al., 2001). In der Keratinozyten-Zelllinie HaCat führte die IL-20-Behandlung über die STAT-3-Aktivierung zur Expression der proinflammatorischen Faktoren TNF- α , des *S100-calcium-binding-protein-A8* (S100A8) und des *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) (Blumberg et al., 2001). Außerdem könnte IL-20 bei den Autoimmunerkrankungen Psoriasis vulgaris und der Rheumatoiden Arthritis von Bedeutung sein. In der Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris konnte eine Überexpression von IL-20 gezeigt werden (Hosoi et al., 2004). Zudem wurde in Gewebeproben entzündlich veränderter Hautläsionen von Patienten mit Psoriasis vulgaris eine Zunahme der Expression des IL-20R in Keratinozyten, Endothelzellen und Monozyten nachgewiesen (Blumberg et al., 2001). Des Weiteren wurden erhöhte IL-20-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis gemessen (Hsu et al. 2006).

3.1.4 Interleukin-22

IL-22 wurde als ein Faktor entdeckt, der von T-Zellen nach IL-10-Stimulation sezerniert wird. Die Identität der Aminosäuresequenz im Vergleich zu IL-10 beträgt etwa 22 % (Dumoutier et al., 2000c). Der IL-22R wird aus der Liganden-bindenden Rezeptorkette IL-22R und der akzessorischen Rezeptorkette IL-10R2 gebildet (Xie et al., 2000; Kotenko et al., 2001a). Die Signaltransduktion kann außerdem über den Typ-I-IL-20R erfolgen. Dabei ist die Signaltransduktion allerdings weniger effizient als über den IL-22R (Blumberg et al., 2001). Des Weiteren

ren konnte ein lösliches Protein mit Strukturhomologien zu IL-22R identifiziert werden, das eine hohe Bindungsaffinität zu IL-22 aufweist. Dieses IL-22-bindende Protein (IL-22BP) fungiert als wasserlöslicher Antagonist für IL-22 am Zellmembran-assoziierten IL-22R (Dumoutier et al., 2001a; Gruenberg et al., 2001; Kotenko et al., 2001b; Xu et al., 2001). IL-22 wird von aktivierten T-Zellen, Mastzellen, Dendritischen Zellen und NK-Zellen exprimiert. Besonders stark ist die Expression in Th17-Zellen ausgeprägt, einem CD4+ T-Zell-Subtyp (Wolk et al., 2002; Liang et al., 2006; Zheng et al., 2007). In aktivierten T-Zellen wurde eine Koexpression von IL-22 mit IFN- γ und IL-26 beobachtet (Wolk et al., 2002). IL-22R wird in verschiedenen Geweben einschließlich der Haut, den Nieren, dem Gastrointestinaltrakt und den Atemwegen gebildet (Wolk et al., 2004; Kunz et al., 2006). IL-22BP wird in hohem Ausmaß von Plazenta- und Mammagewebe exprimiert (Dumoutier et al., 2001a; Gruenberg et al., 2001; Xu et al., 2001). Aber auch Dendritische Zellen können IL-22BP produzieren (Nagalakshmi et al., 2004a).

IL-22 ist in die Regulation von Entzündungsreaktionen der Leber (Dumoutier et al., 2000c), des Pankreas (Aggarwal et al., 2001), des Darms (Nagalakshmi et al., 2004b) und der Haut (Wolk et al., 2004; Boniface et al., 2005) involviert und führt vorwiegend zur Induktion proinflammatorischer Proteine. Eine mögliche Rolle von IL-22 in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen wird diskutiert. IL-22 führt zu einer Induktion der Akut-Phase-Proteine Serum-Amyloid-A, α 1-Antichymotrypsin und Haptoglobin in der Leber (Dumoutier et al., 2000c). In einer Hepatom-Zelllinie konnte auch eine SOCS-3-Induktion beobachtet werden (Kotenko et al., 2001b). Keratinozyten werden durch eine IL-22-Behandlung zur Produktion der proinflammatorischen und antimikrobiellen Proteine S100A7-Psoriasin, S100A8 und S100A9 stimuliert (Broome et al., 2003). Außerdem kommt es zu einer dosisabhängigen Expression von β -Defensin-2 und β -Defensin-3 (Wolk et al., 2004). Klinische Studien lassen vermuten, dass eine durch IL-23 induzierte Expression von IL-22 eine wesentliche Rolle in der mukosalen Immunreaktion von Lunge und Darm und bei der Progression der Autoimmunerkrankung Psoriasis vulgaris spielt (Schoenmakers et al., 1995; Donnelly et al., 1999; Aggarwal et al., 2001; Blumberg et al., 2001; Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004; Yoon et al., 2006 und 2010). In der Haut führt IL-22 zu einer Hyperproliferation von Keratinozyten mit daraus resultierender Verdickung der Epidermis (Dambacher et al., 2009). Bei Patienten mit Psoriasis vulgaris konnte eine positive Korrelation zwischen Erkrankungsschwere und der IL-22-Plasmakonzentration gezeigt werden (Wolk et al., 2006). IL-22 könnte auch in der Pathogenese der Autoimmunerkrankung Morbus Crohn von Bedeutung sein. In Untersuchungen konnten IL-22-exprimierende CD4+ T-Zellen in entzündlichen Kolonläsionen nachgewiesen werden (Andoh et al., 2005; Dambacher et al., 2009). Zudem wurden bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte IL-22-Plasmakonzentrationen gemessen (Wolk et al., 2007). Auch bei der Rheumatoiden Arthritis führt IL-22 durch

Stimulation der Proliferation synovialer Fibroblasten und Induktion verschiedener Proteine zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktionen (Ikeuchi et al., 2005).

3.1.5 Interleukin-24

Das Zytokin IL-24 wurde in humanen Melanomzelllinien nach Behandlung mit IFN- β und dem Proteinkinase-C-Aktivator Mezerein identifiziert und zunächst als *melanoma differentiation associated gene 7* bezeichnet (Jiang et al., 1995; Wang et al., 2002). Wie IL-19 und IL-20 nutzt IL-24 den Typ-I-IL-20R. Eine Signaltransduktion über den Typ-II-IL-20R ist ebenfalls möglich (Dumoutier et al., 2001a; Parrish-Novak et al., 2002). IL-24 wird hauptsächlich von Th2-Zellen und aktivierten Leukozyten gebildet (Schaefer et al., 2001; Ellerhorst et al., 2002). IL-24 induziert die Expression von IL-6, TNF- α und IFN- γ in myeloischen Zellen des peripheren Bluts (Caudell et al., 2002). Außerdem führte IL-24 zu einem Wachstumsstopp oder zur Apoptose bei einer Reihe von Tumorzelllinien, ohne dass aber eine Beeinflussung gesunder Zellen stattfand (Jiang et al., 1996; Saeki et al., 2000 und 2002; Mhashilkar et al., 2001; Cao et al., 2002; Lebedeva et al., 2002; Sarkar et al., 2002; Sauane et al., 2003). IL-24 führt des Weiteren zu einer Hemmung der Angiogenese (Ramesh et al., 2003).

IL-24 zeigte außerdem eine gegen maligne Tumore gerichtete Aktivität. Die intramurale Injektion eines Adenovirus-Vektors zur Expression des IL-24-Gens führte zu einer nachweisbaren Apoptose von Tumorzellen (Cunningham et al., 2005; Tong et al., 2005).

3.1.6 Interleukin-28A, Interleukin-28B und Interleukin-29

Die Zytokine IL-28A, IL-28B und IL-29 werden auch als λ -IFNe klassifiziert und alternativ als IFN- λ 1, IFN- λ 2 und IFN- λ 3 bezeichnet. Alle drei weisen nur geringe Sequenzhomologie zu IL-10 auf, haben jedoch einen ähnlichen genomischen Aufbau wie die übrigen Mitglieder der IL-10-Zytokin-Familie. Sie bestehen aus mehreren Exons und nutzen, wie verschiedene andere IL-10-Familien-Mitglieder, IL-10R2 als akzessorische Rezeptorkette (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Alle drei Gene sind in enger Nachbarschaft auf Chromosom 19 in der Region 19q13 lokalisiert (Kotenko et al., 2003). Die Signaltransduktion erfolgt über den gemeinsamen Rezeptor, der aus der Liganden-bindenden Rezeptorkette IFN- λ R1 und IL-10R2 besteht. Im Gegensatz zu den anderen IL-10-Familien-Mitgliedern kommt es zu der vorwiegenden Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-2. Diese Faktoren bilden zusammen mit dem *IFN-regulatory factor (IRF)-9* den Transkriptionsfaktorenkomplex *IFN-stimulated-gene-factor (ISG)-3*, der auch mit der Signaltransduktion der Typ-I-IFNe assoziiert ist (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003).

Produzenten	Rezeptorketten	Wirkung	Zielzellen
IL-10			
Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Dendritische Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und Granulozyten	IL-10R1/IL-10R2	Suppression der Antigenpräsentation über den MHC-II, Hemmung der Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF- α , Inhibierung der IFN- γ -Sekretion, Aktivierung der Immunglobulinproduktion in B-Lymphozyten	hämatopoetische Zellen wie Monozyten, Dendritische Zellen, B- und T-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen
IL-19			
Monozyten, Makrophagen, B-Zellen	Typ-I-IL-20R (IL-20R1/IL-20R2)	Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α , Apoptoseinduktion in murinen Monozyten, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	somatische Zellen von Haut, Lunge, Geschlechtsorganen und verschiedenen Drüsen
IL-20			
Keratinocyten, Gliazellen, Monozyten, Dendritische Zellen	Typ-I-IL-20R (IL-20R1/IL-20R2), Typ-II-IL-20R (IL-22R/IL-20R2)	Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , S100A8 und MCP-1	Keratinocyten, Endothelzellen, Monozyten
IL-22			
T-Zellen, Mastzellen, NK-Zellen, Dendritische Zellen	Typ-I-IL-20R (IL-20R1/IL-20R2), Typ-II-IL-20R (IL-22R/IL20-R2), IL-22BP	Expression der Akutphase-Proteine Serum-Amyloid, α_1 -Antichymotrypsin und Haptoglobin, Expression der proinflammatorischen Faktoren S100A7-Psoriasin, S100A8, S100A9, β -Defensin 2 und β -Defensin- 3, Induktion von SOCS-3	somatische Zellen von Haut, Nieren, Atemwegen und Gastrointestinaltrakt
IL-24			
Th2-Zellen, Mononukleäre Zellen, somatische Zellen wie z.B. Keratinocyten	Typ-I-IL-20R (L-20R1/IL-20R2), Typ-II-IL-20R (IL-22R/IL-20R2)	Induktion eines Wachstumsstopp oder Apoptose in verschiedenen Tumorzelllinien, Hemmung der Angiogenese, Verstärkung der Expression von IL-6, TNF- α und IFN- γ in myeloischen Zellen	somatische Zellen
IL-26			
T-Zellen, NK-Zellen, spezielle Synoviozyten	IL-20R1/IL10-R2	Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8	Epithelzellen von Haut, Kolon, Geschlechtsorganen, Herz, Speicheldrüsen
IL-28A, IL-28B, IL-29			
nahezu alle virusinfizierten somatischen Zellen, Dendritische Zellen	IFN- λ R1/IL-10R2	Expression der antiviral wirksamen Gene MxA, 2'5'-OAS und PKR, Hochregulation der MHC-1-Expression	alle

Tab. 1: Tabellarische Übersicht über die Mitglieder der IL-10-Zytokin-Familie. Gegenüberstellung von Zelltypspezifitäten, verwendeten Rezeptorketten, Wirkungen und Zielzellen.

IL-28A, IL-28B und IL-29 werden wie die Typ-I-IFNe IFN- α und IFN- β von virusinfizierten Zellen exprimiert (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Eine deutlich erhöhte Expression wurde in Dendritischen Zellen gemessen (Coccia et al., 2004). Die biologischen Effekte von IL-28A, IL-28B und IL-29 ähneln denen der Typ-I-IFNe. In verschiedenen Tumorzelllinien wurde eine vermehrte Expression von MHC-I-Molekülen beobachtet (Kotenko et al., 2003). Außerdem kommt es zu einer vermehrten Bildung antiviral wirksamer Faktoren wie dem

Myxovirus resistance gene A (MxA), der 2'5'-Oligoadenylat-Synthetase (2'5'-OAS) und der Proteinkinase R (PKR), die auch für die antiviralen Effekte der Typ-I-IFNe verantwortlich gemacht werden (Brierley & Fish, 2002). Die wesentlichen Eigenschaften der Zytokine aus der IL-10-Familie sind in der Tab. 1 aufgelistet.

3.1.7 Interleukin-26

IL-26 wurde aufgrund seiner Überexpression in humanen T-Zellen entdeckt, die in Zellkultur zu stabilem Wachstum transformiert wurden. Die Wachstums-Transformation erfolgte dabei mit Herpesvirus saimiri, einem T-Zell-Tumor-Virus von Neuweltaffen. Durch subtraktive Hybridisierung erfolgte die Klonierung einer 1076 bp umfassenden komplementären DNA (cDNA), die für ein Polypeptid mit 171 Aminosäuren kodiert. IL-26 hat aufgrund seines hohen Anteils positiv geladener Aminosäuren wie Lysin oder Arginin eine positive elektrische Ladung. Der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 10,77. IL-26 weist eine 24,7 %-ige Aminosäure-Identität und eine 47 %-ige Aminosäure-Ähnlichkeit mit IL-10, dem Prototypen der IL-10-Zytokin-Familie, auf (Knappe et al., 2000).

Das IL-26-Gen ist auf Chromosom 12 in der Region 12q15 in unmittelbarer Nachbarschaft zu IFN- γ und IL-22 lokalisiert (Dumoutier et al., 2000b; Knappe et al., 2000). Alle drei Gene sind in gleicher Orientierung auf das Zentromer ausgerichtet und werden gemeinsam von mit Herpesvirus saimiri transformierten T-Zellen überexprimiert, was das Vorliegen gemeinsamer Regulationsmechanismen wahrscheinlich macht. Das Gen besteht aus fünf Exons, die von drei kleineren und einem großen Intron unterbrochen werden (Knappe et al., 2000).

Bei den meisten Wirbeltierarten einschließlich Fischen, Fröschen und Vögeln konnte das IL-26-Gen nachgewiesen werden. Innerhalb des murinen Genoms fehlt es jedoch vollständig. Analysen der Genome von Pufferfisch (*Takifugu rubripes*), Zebrafisch (*Danio rerio*) und des tropischen Krallenfrosches (*Xenopus tropicalis*) ergaben eine starke Konservierung des Genclusters von IL-22, IL-26 und IFN- γ . Während die Sequenzübereinstimmung mit den IL-26-Paralogen anderer Säugetierarten zwischen 85-95 % liegt, ist diese bei Spezies wie Zebrafisch und Fröschen mit 17-30 % wesentlich geringer (Igawa et al., 2006; Qi & Nie, 2008; Savan et al., 2009).

Das IL-26-Polypeptid ist aus sechs α -Helices aufgebaut, die Cystein-Reste beinhalten, welche für die Ausbildung intermolekularer Bindungen essentiell erscheinen. Wie IL-10 bildet IL-26 Homodimere aus. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass sich das Molekulargewicht von IL-26 in der Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Vergleich zu denaturierenden Bedingungen von 19 kDa auf 36 kDa nahezu verdoppelt (Knappe et al., 2000).

Der IL-26R ist ein heterodimerer Klasse-II-Zytokin-Rezeptor, der aus der Liganden-bindenden Rezeptorkette IL-20R1 mit einer langen intrazellulären Domäne und der akzessorischen Rezeptorkette IL-10R2 mit einer kurzen intrazellulären Domäne besteht. Nach Bindung von IL-26 an IL-20R1 kommt es zu konformationellen Veränderungen, welche zu der Anlagerung von IL-10R2 führen. Dies bewirkt eine Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen JAK1 und Tyk2, durch welche die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und STAT-3 erfolgt. Anschließend kommt es zu der Translokation von homodimerem phospho-STAT (pSTAT)-1 und -3 in den Zellkern (Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004). Dabei kommt es in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Colo-205 zu einer präferentiellen Phosphorylierung von STAT-3 gegenüber STAT-1 (Sheikh et al., 2004). Für die Rezeptorkette IL-20R1 existieren drei verschiedene mRNA-Transkripte als alternative Spleißvarianten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Signaltransduktion über den IL-26R nur in Zelllinien mit der Expression des vollständigen Transkripts mit 3,6 kb stattfand (Sheikh et al., 2004). Diese Mechanismen sind in Abb.1 skizziert.

Das Zytokin IL-26 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen exprimiert. Jedoch können auch Leukozyten des peripheren Blutes, NK-Zellen sowie Fibroblasten- und Makrophagen-ähnliche Synoviozyten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis IL-26 exprimieren (Knappe et al., 2000; Wolk et al., 2002; Hör et al., 2004; Nagalakshmi et al., 2004a; Corvaisier et al., 2012). IL-26 ist zudem ein Marker für einen bestimmten Subtyp von Th17 CD4+ T-Zellen, welche sich über eine durch IL-23 induzierbare Transkription von IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, IFN- γ und dem *chemokine-(C-C motif)-ligand-20* auszeichnen (Wilson et al., 2007). Außerdem ist ein Subtyp von CD56+ NKp44+ NK-Zellen durch eine Koexpression von IL-26 und IL-22 charakterisiert. Diese trat insbesondere nach Stimulation der Zellen mit IL-23 auf (Cella et al., 2009; Hughes et al., 2009).

IL-26R wird vorwiegend auf epithelialen Zellen exprimiert. Die Expression des Rezeptors wurde bei Zellen des Immunsystems aber nicht beobachtet (Blumberg et al., 2001; Wolk et al., 2002; Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004). Da die Rezeptorkette IL-10R2 von nahezu allen Körperzellen gebildet wird (Aggarwal et al., 2001; Wolk et al., 2002), entscheidet die Expression der Rezeptorkette IL-20R1 darüber, ob eine Zelle für IL-26 sensibel ist. IL-20R1 wird in hohem Ausmaß von Epithelzellen der Haut und des Kolons exprimiert. Auch verschiedene Tumorzelllinien der Leber und des Kolon bilden IL-20R1 (Hör et al., 2004; Nagalakshmi et al., 2004b; Sheikh et al., 2004; Dambacher et al., 2009). Geringere Mengen an IL-20R1-Transkripten konnten außerdem in Herz, Speicheldrüsen, Hoden, Prostata und Plazenta entdeckt werden (Blumberg et al., 2001).

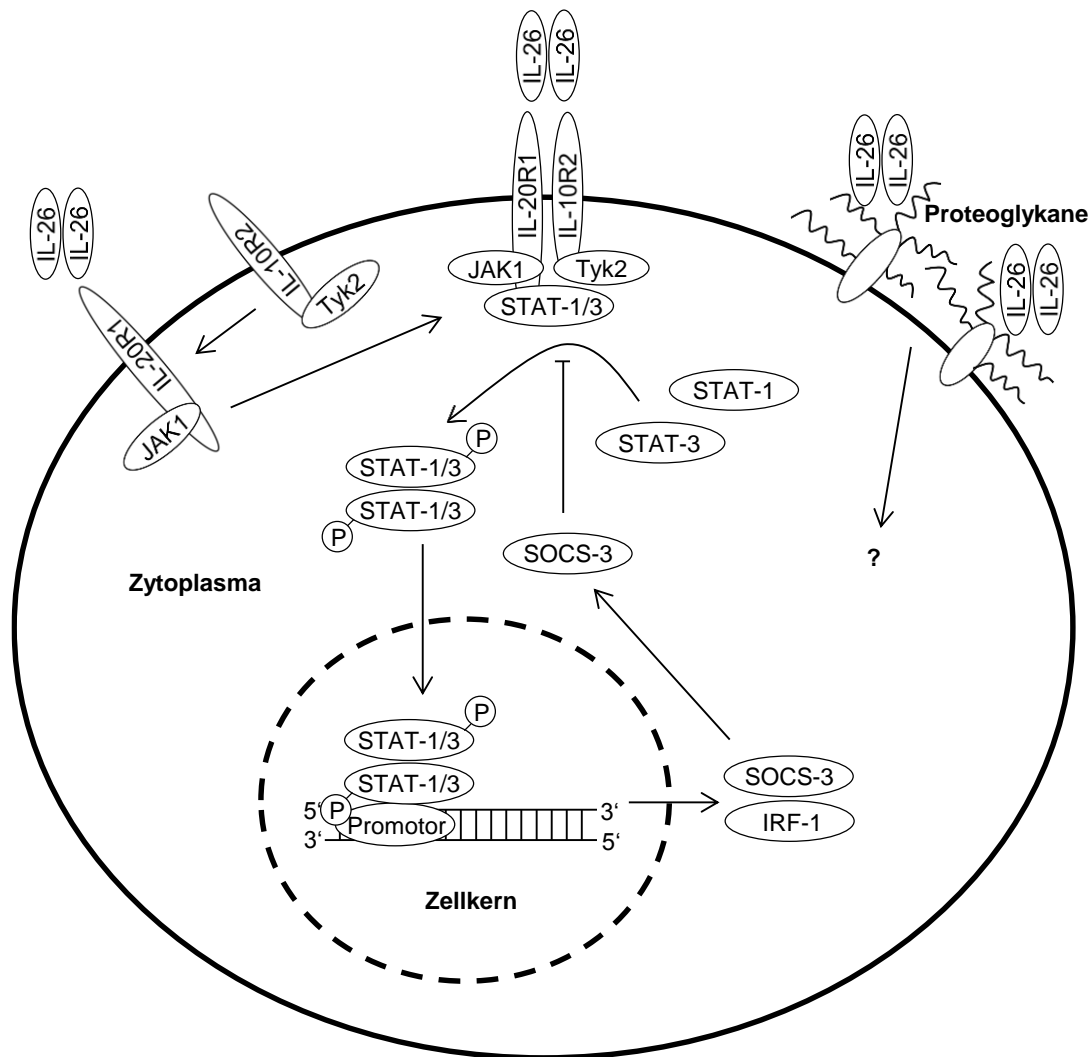


Abb. 1: Schematische Darstellung der Signaltransduktion über den IL-26R. Die Bindung von homodimerem IL-26 an IL-20R1 führt zu konformationellen Änderungen, welche die Anlagerung von IL-10R2 bewirkt (links oben). Durch die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen JAK1 und Tyk2 kommt es zu der Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und STAT-3 (Mitte). Diese bilden Dimere aus und werden in den Zellkern transloziert. Nach Bindung an entsprechende Promotoren kommt es zur Expression von SOCS-3 und IRF-1. SOCS-3 bewirkt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Inhibition der STAT-Phosphorylierung über die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen (unten). IL-26 bindet an Proteoglykane der Zelloberfläche. Eine von IL-26R unabhängige Signaltransduktion ist möglich. Die genauen Mechanismen sind aber derzeit noch nicht bekannt (rechts oben).

In T-Zell-Kulturen ist nur ein geringer Anteil von IL-26 im Kulturüberstand nachweisbar, da der überwiegende Teil Zell-assoziiert verbleibt (Knappe et al., 2000). Aufgrund der positiven Ladung von IL-26 und dem berechneten isoelektrischen Punkt von 10,77 wird eine Assoziation mit Proteoglykanen der Zelloberfläche vermutet. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass IL-26 eine starke Bindung an Glykosaminoglykane wie Heparin aufweist, das eine Vielzahl negativ geladener Sulfatreste beinhaltet. Durch Zugabe von Heparin konnte die IL-26-abhängige STAT-3-Phosphorylierung vollständig blockiert werden. Dieser Effekt wurde in geringerem Ausmaße auch bei anderen Glykosaminoglykanen beobachtet. Die Bindung von IL-26 wird somit nicht alleine von der Ladung der Glykosaminoglykane, sondern auch von deren strukturellem Aufbau beeinflusst (Hör et al., 2004). Proteoglykane

der Zelloberfläche weisen eine ähnliche Struktur wie Glykosaminoglykane auf und könnten durch eine unmittelbare Bindung von IL-26 zu auto- oder parakrinen Effekten führen. IL-26 könnte dabei aufgrund unterschiedlicher Expressionsmuster der Proteoglykane zelltypspezifische Effekte und lokale Kontakt-basierte Effekte bewirken (Hör et al., 2004).

Die biologischen Effekte von IL-26 und seine Bedeutung für die körpereigenen Regulationsmechanismen sind noch weitgehend unerforscht. Allerdings zeichnet sich ab, dass IL-26 eine Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen spielt. So führt IL-26 beispielsweise zu einer Induktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 in Keratinozyten und intestinalen Epithelzellen (Hör et al., 2004; Dambacher et al., 2009). Außerdem führte die Behandlung der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 mit IL-26 zu einer verstärkten Bildung von IL-8, TNF- α und der Transkription von SOCS-3 (Dambacher et al., 2009). Die SOCS-3-Expression führt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus zu der Hemmung der über IL-26R vermittelten Signaltransduktion (Dambacher et al., 2009). Außerdem bewirkt IL-26 eine rasche posttranskriptionelle Modifikation von IRF-1, woraus sich Einflüsse auf bakterielle und virale Infektionen ergeben könnten (Braun, 2013).

3.2 Humanes Cytomegalovirus

hCMV gehört zur Gruppe der Herpesviren, die aufgrund unterschiedlicher biologischer Eigenschaften in die α -, β - und γ -Herpesviren aufgeteilt wird. Zu den α -Herpesviren zählen das Herpes-simplex-Virus (HSV) Typ 1 und Typ 2 und das Varicella-Zoster-Virus. hCMV gehört zusammen mit den Humanen Herpesviren 6 und 7 in die Gruppe der β -Herpesviren. Die Vertreter der γ -Herpesviren sind das Epstein-Barr-Virus und das Humane Herpesvirus 8, das auch als Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus bezeichnet wird.

3.2.1 Epidemiologie

hCMV kommt weltweit und ubiquitär vor. Die Prävalenz spezifischer Antikörper in der Bevölkerung variiert jedoch stark in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Standard der untersuchten Länder. Die Prävalenz in den Industriestaaten Amerikas, Westeuropas und in Australien ist dabei niedriger als in den Ländern der Dritten Welt (Krech, 1973). Für viele Länder Afrikas und Asiens beträgt die Antikörperprävalenz nahezu 100 %, während die Prävalenz in den Industriestaaten zwischen 40 und 70 % liegt (Lamberson & Dock, 1992). Der Durchseuchungsgrad der Bevölkerung nimmt mit dem Alter zu. Dabei werden zwei Erkrankungsgipfel beobachtet. Der Erste ist in den ersten zwei bis drei Lebensjahren, welcher vor allem durch Schmierinfektionen mit Speichel verursacht wird und ein Zweiter im Alter von 16 bis 30 Jahren, in dem die Übertragung hauptsächlich durch Sexualkontakte geschieht

(Staras et al., 2008). Der Anteil seropositiver Individuen steigt danach im Alter auf 50 bis 70 % an (Mocarski, 1994).

3.2.2 Übertragung

Eine horizontale Transmission zwischen Mitgliedern derselben Spezies ohne Übertragung von der Mutter auf das Kind wird von einer vertikalen Transmission von der Mutter auf den Fötus oder das Neugeborene unterschieden. Die horizontale Transmission geschieht durch direkten Kontakt mit infektiösen Körperflüssigkeiten. Eine Übertragung durch Urin, Speichel, Tränen, Sperma und Zervikalsekret, aber auch über Bluttransfusionen oder Organtransplantationen bei seropositiven Spendern ist möglich. Als Risikofaktoren für die Übertragung wurden erhöhte Marker sexueller Aktivität und der Kontakt zu Kleinkindern identifiziert (Chandler et al., 1985; Pereira et al., 1990; Sohn et al., 1991; Coonrod et al., 1998). In Kohortenstudien konnte gezeigt werden, dass eine Verbreitung von hCMV vor allem dort auftritt, wo viele Kleinkinder zusammenkommen, wie es z.B. in Kindertagesstätten der Fall ist (Pass et al., 1984; Murph et al., 1986; Adler, 1988). Dies ist unter anderem durch vermehrte Mund-Hand-Kontakte und über gemeinsam genutztes Spielzeug zu erklären. Bei infizierten Individuen war die Ausscheidung von hCMV über Speichel und Urin teilweise über Jahre hinweg nachweisbar (Hutto et al., 1986; Britt, 2006b). Die vertikale Transmission kann transplazentar, intrapartal oder über die Muttermilch erfolgen. Bei der transplazentaren Übertragung können Primärinfektionen, Reinfektion oder die Reaktivierung einer latenten Infektion zu einer Übertragung führen (Boppana et al., 2001). Die intrapartale Transmission geschieht über lokalen Kontakt zu infektiösem Zervikalsekret. In verschiedenen Untersuchungen war nahe dem Geburtstermin bei 2-28 % der Frauen hCMV in Vagina oder Zervix nachweisbar (Stagno et al., 1982). Die Transmissionsraten liegen bei hCMV-Nachweis bei etwa 50 % (Reynolds et al., 1973). Eine Übertragung des Virus ist auch über die Muttermilch möglich. In ca. 95 % der Milchproben seropositiver Mütter konnte hCMV-DNA detektiert werden (Hotsubo et al., 1994; Asanuma et al., 1996; Vochem et al., 1998; Jim et al., 2004).

Die Inzidenz einer kongenital übertragenen hCMV-Infektion liegt zwischen 0,3 und 1,2 % (Hamprrecht & Jahn, 2007). Die Infektion erfolgt zumeist nach einer Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft mit einer Transmissionsrate von 40-50 % (Hamprrecht & Jahn, 2007). Etwa 7-10 % der infizierten Kinder entwickeln Symptome einer hCMV-Infektion, von denen ca. 10 % an den Folgen der Erkrankung versterben (Mandell et al., 1995; de Jong et al., 1998). Die postnatale Transmission über die Muttermilch wurde bei etwa 35-40 % der Frühgeborenen seropositiver Mütter beobachtet. Reifgeborene sind hingegen weniger gefährdet (Trincado & Rawlinson, 2001; Meier et al., 2005; Hamprrecht & Jahn, 2007).

3.2.3 Klinik

Im Regelfall verläuft eine hCMV-Infektion im immunkompetenten Wirt klinisch stumm. Die Ausbildung eines febrilen Infektes mit Zeichen einer Mononukleose, ähnlich einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus, bis hin zu schweren Erkrankungen mit Organversagen sind jedoch möglich (Stagno et al., 1986). Zu den Symptomen, den klinischen und laborchemischen Befunden einer hCMV-Infektion gehören Fieber, zervikale Lymphadenopathie, exsudative Pharyngitis, Myalgien, Müdigkeit, Hepatosplenomegalie, Hautekzeme, ein Transaminasenanstieg und eine Lymphozytose mit atypischen Lymphozyten (Klemola et al., 1970; Jordan et al., 1973; Pannuti et al., 1985). Schwere Verläufe nach einer Primärinfektion bis hin zum Organversagen sind bei immunkompetenten Individuen sehr selten. Zu den spezifischen, durch hCMV verursachten Organerkrankungen zählen eine Enteritis, Thromboembolien, Thrombopenie, hämolytische Anämie, Enzephalitis, Neuropathien, Myokarditis und Augenentzündungen, die im Regelfall nur bei immunsupprimierten Individuen beobachtet werden (Eddleston et al., 1997; Laing et al., 1997).

Durch transplazentare Übertragung kann es zu einer kongenitalen hCMV-Infektion kommen. Diese äußert sich in abnehmender Häufigkeit mit Petechien oder Purpura, niedrigem Geburtsgewicht, Hepatosplenomegalie, Ikterus, hämolytischer Anämie, Pneumonie sowie neurologischen Auffälligkeiten wie intrakraniellen Kalzifikationen, Mikrozephalie, Hörminderung, Chorioretinitis, Krampfanfällen und dem Tod des Fötus (Istas et al., 1995). Entscheidend für die Prognose einer kongenitalen Infektion ist das Gestationsalter zum Zeitpunkt der Infektion und, ob es sich um eine primäre Infektion der Mutter oder Reaktivierung einer latenten Virusinfektion handelt. Generell scheint das Ausmaß der Schädigung mit abnehmendem Gestationsalter und bei Vorliegen einer Primärinfektion zuzunehmen (Fowler et al., 1992; Faucher et al., 1998; Pass et al., 2006).

hCMV ist ein wichtiger opportunistischer Krankheitserreger bei immunsupprimierten Patienten. Dabei kommen sowohl die Primärinfektion als auch die Reaktivierung des Virus vor. In Patienten nach Organtransplantation werden eine akute febrile Erkrankung, organspezifische Effekte und indirekte Effekte beobachtet (Ljungman et al., 2002). Zu den organspezifischen Erkrankungen zählen die Pneumonie, Colitis, Hepatitis, Retinitis, Pankreatitis, Myokarditis, Enzephalitis und Neuropathie. Als indirekte Effekte werden die Transplantatabstoßung, eine beschleunigte Arteriosklerose der Koronararterien und ein erhöhtes Risiko für Bakterien- und Pilz-Infektionen beobachtet (Kim et al., 2000). Bei mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infizierten Patienten korreliert das Risiko einer Erkrankung eng mit der Anzahl der CD4+ T-Zellen (Reimer & Meisel, 1996). Innerhalb von zwei Jahren erkranken 21,4 % der Patienten mit einer CD4-T-Zell-Zahl von $< 100 /\text{mm}^3$ im Gegensatz zu 10,3 % mit $> 100 /\text{mm}^3$ an hCMV (Cheung & Teich, 1999).

3.2.4 Diagnostik

Zur Diagnostik einer hCMV-Infektion stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Möglich sind der direkte Nachweis des Virus in Zellkultur, der Nachweis viraler Antigene, der hCMV-DNA und der Nachweis spezifischer IgM- und IgG-Antikörper (Reimer & Meisel, 1996; Haller & Mertens, 1999). Als Primärdiagnostik kann der Antigennachweis des viralen phosphorylierten Proteins pp65 in neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes erfolgen. Dies wurde aber weitestgehend zugunsten des quantitativen Nachweises der hCMV-DNA über Nukleinsäureamplifikation aus Blut ersetzt. Mit diesen Methoden ist der Nachweis einer Infektion auch vor einer Serokonversion möglich (Mocarski, 1994; Staras et al., 2008). Des Weiteren kann die Infektion über den Anstieg von spezifischen IgM- und IgG-Antikörpertitern aus Serumproben erfolgen, die im Abstand von zwei Wochen entnommen werden (Preiksaitis et al., 2005). Bei Transplantationspatienten erfolgt zum Monitoring einer möglichen Infektion neben dem quantitativen Nachweis von pp65 in neutrophilen Granulozyten vor allem die quantitative Viruslast-Bestimmung aus dem Blut (Petrik, 2006).

3.2.5 Aufbau und Replikation

hCMV weist den typischen Aufbau aller Herpesviren auf (Mocarski & Courcelle, 2001; Liu & Zhou, 2006). Das Virus ist von einer Lipiddoppelschicht umhüllt, die sich vom Endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle ableitet (Britt, 2006a; Liu & Zhou, 2006; Mocarski, 2006a). Diese Hülle umgibt ein ikosaedrisches Nukleokapsid, welches das lineare DNA-Genom mit ca. 235 kbp beinhaltet (Prichard et al., 1998). Das Nukleokapsid ist in das sogenannte Tegument oder die Matrix eingebettet (Kattenhorn et al., 2004; Varnum et al., 2004). Das Tegument ist unter der Virusmembran eine amorphe Schicht des Virus, welche viele virale Proteine wie beispielsweise Transaktivatoren oder Zelltyp-spezifische Funktionen enthält (Britt & Boppana, 2004; Gerna et al., 2005). hCMV weist eine Spezies- und Zelltypspezifität und die Eigenschaft auf, dass es weitgehend Zell-assoziiert verbleibt. In Studien an Autopsiematerial von immunsupprimierten Patienten, die an einer akuten hCMV-Infektion verstorben waren, konnte gezeigt werden, dass Antigene und Nukleinsäuren des hCMV vor allem in Epithel-, Endothelzellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen nachweisbar waren (Gerna et al., 2004; Digel & Sinzger, 2006).

Im Vergleich zu anderen Viren ist der Replikationszyklus von hCMV langsam und es vergehen etwa 48-72 h zwischen dem Eintritt des Virus in die Zielzelle und der Freisetzung der Viruspartikel. Das Virus bindet an Heparansulfate auf der Oberfläche der Zielzellen. Die Bindung erfolgt dabei auch an Zelltypen, in denen eine Replikation nicht möglich ist (Compton & Fiere, 2006; Mocarski, 2006b). Durch die Bindung wird unter Einbeziehung weiterer zellulärer Rezeptoren eine Kaskade von Ereignissen in Gang gesetzt, welche zum Eintritt des Virus in

die Zelle führt (Boyle & Compton, 1998). Welche Rezeptoren hCMV dabei verwendet, ist derzeit weiterhin unbekannt. Der Eintritt von hCMV geschieht hauptsächlich über eine direkte Fusion mit der Zellmembran (Compton & Fiere, 2006). Eine Endozytose des Virus wird beispielsweise in Endothelzellen beobachtet (Ryckman et al., 2006). Wenn das virale Nukleokapsid im Zytoplasma freigesetzt wurde, erfolgt die Assoziation mit zellulären Mikrotubuli und die Translokation zum Zellkern, wo die virale DNA freigesetzt wird (Döhner & Sodeik, 2004).

Während des Replikationszyklus von hCMV gliedert sich die virale Genexpression in drei Abschnitte, die als *immediate early (IE)*-, *delayed early (DE)*- und *late (L)*-Phase bezeichnet werden. Unmittelbar nach der Freisetzung der viralen DNA im Zellkern beginnt die Expression der *immediate early*-Gene (Stratton et al., 2001; White & Spector, 2006). Im hCMV-Genom gibt es verschiedene IE-exprimierte Regionen. Die Region *immediate early-1* kodiert unter anderem das phosphorylierte Protein 72 (pp72), das über die Suppression von STAT-Faktoren zur Limitierung der IFN-Expression führt (Mocarski & Courcelle, 2001; Paulus et al., 2006). Zu den Hauptfunktionen der IE-Gene gehört die Regulation der DE- und L-Genexpression (Stinski & Meier, 2006). Die DE-Phase beginnt etwa 6 h post infectionem (p.i.). In dieser Phase wird der Großteil des viralen Genomes transkriptionell aktiv. Die mehr als 23 verschiedenen DE-Gene sind wesentlich für die virale DNA-Synthese und die Reifung des Nukleokapsids. Das Tegumentprotein pp65 ist das dominierende DE-Protein (Dworsky et al., 1983; Yu et al., 2003). Die Spätphase (L-Phase) der Replikation beginnt 24-36 h p.i. und mündet in einer maximalen Virusfreisetzung nach 72-96 h p.i. (McCormick et al., 2005; McCormick & Mocarski, 2006). In der L-Phase kommt es zur Expression der viralen DNA-Polymerase. Das phosphorylierte Protein 52 (pp52) ist eine Untereinheit dieser DNA-Polymerase (McMahon & Anders, 2002). Im Zellkern bildet sich ein Replikationskompartiment und es kommt zu zytoplasmatischen Einschlüssen, welche die Verpackung und die Freisetzung der Viruspartikel steuern (Penfold & Mocarski, 1997). Nach Assemblierung des Nukleokapsids und Verpackung der Virus-DNA erfolgt die anschließende Freisetzung durch Exozytose (Gewurz et al., 2001; Mettenleiter, 2004).

3.2.6 Pathogenese und Viruslatenz

Die Primärinfektion mit hCMV geht typischerweise mit der viralen Replikation in Schleimhäuten nach direktem Kontakt mit infektiösem Sekret einher (Cannon & Davis, 2005). Während der systemischen Phase der Infektion kommt es zu einer Leukozyten-assoziierten Virämie. Unreife Monozyten des Knochenmarks und ihre Vorläufer konnten als Vehikel für die Dissemination des Virus identifiziert werden. Unmittelbar nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle kommt es zu Veränderungen der Zellhomöostase (Compton & Fiere, 2006). Unter anderem bewirkt hCMV eine Dysregulation des Zellzyklus mit Ausbildung eines Mitose-ähnlichen Sta-

diums und eine Störung der zelleigenen Abwehrmechanismen, einschließlich der Expression des IRF-3, der IFN-Expression und der zellulären Apoptosemechanismen (Skaletskaya et al., 2001; Hertel & Mocarski, 2004; Smith & Mocarski, 2005; White & Spector, 2006). Virales pp65 führt im Zellkern zu der verminderten Transkription von IFN und des proinflammatorischen *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) (Browne & Shenk, 2003) und zu der Translokationshemmung des IRF-3 in den Zellkern (Abate et al., 2004). Das pp72 bildet einen Komplex mit STAT-1 und STAT-2, welcher die Assoziation des IRF-9 mit seinen Promotoren verhindert (Paulus et al., 2006).

Die Immunreaktion gegen hCMV ist vorwiegend Zell-basiert und wird über T-Zellen, Dendritische Zellen und NK-Zellen vermittelt, die auch für eine lebenslange Kontrolle der latenten hCMV-Infektion wichtig sind (Salazar-Mather et al., 2000 und 2002; Dalod et al., 2002 und 2003). T-Zellen sind als Teil des adaptiven Immunsystems an der Kontrolle der Virusinfektion beteiligt. Dagegen spielen Makrophagen keine Rolle (Noda et al., 2006). Die Bedeutung von T- und NK-Zellen wird dadurch hervorgehoben, dass hCMV verschiedene Gene exprimiert, welche die T- und NK-Zell-vermittelte Erkennung virusinfizierter Zellen verhindern und die Wirtszellen durch Herunterregulierung der MHC-I-Expression weniger empfänglich für eine NK-Zell-gesteuerte Lyse machen (Falk et al., 2002; Mocarski, 2004). Da Patienten, die infolge ihrer HIV-Infektion erniedrigte T-Zellzahlen aufweisen, empfänglicher für schwere Verläufe einer hCMV-Infektion sind, wird die Bedeutung der T-Zell-vermittelten Immunantwort bestätigt (Deayton et al., 2002; Tamarit et al., 2004; Bronke et al., 2005). Die humorale Immunantwort über Antikörper nimmt dagegen eine untergeordnete Rolle ein. In experimentellen Untersuchungen ergaben sich jedoch Hinweise für eine Protektion des Wirts vor einer hCMV-Infektion (Pass, 2001). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass hCMV-spezifische Immunglobuline in hoher Dosierung eine transplazentare Übertragung des Virus verhindern (Nigro et al., 2005). Eine erworbene Immunität gegen hCMV schützt aber nicht vor einer Reinfektion, jedoch ist die Präexistenz einer zellulären Immunität ein entscheidender Faktor für die Limitation der akuten Infektion sowohl bei immunkompetenten als auch immunsupprimierten Individuen (Tu et al., 2006; Wills et al., 2006).

Die hCMV-Infektion führt zu einer lebenslangen Latenz des Virus. Dabei wird eine persistente Replikation auf niedrigem Niveau diskutiert (Pass, 2001). Diese andauernde Virusreplikation tritt vor allem in Speicheldrüsen und in den Nieren auf und führt zu einer intermittierenden Ausscheidung von Viruspartikeln über das gesamte Leben hinweg. Myeloische Vorläuferzellen des peripheren Blutes werden außerdem mit der Latenz in Verbindung gebracht (Reeves et al., 2005b; Heineman et al., 2006; Mocarski et al., 2006). Als Pathomechanismus wird neben der oben dargestellten Immunevasion durch virale Genprodukte eine Unterdrückung der viralen Genexpression durch die Wirtszelle diskutiert, welche durch Zytokine

und Wachstumsfaktoren beeinflusst wird. Proinflammatorische Zytokine werden als wichtige Mediatoren der Reaktivierung einer latenten hCMV-Infektion angesehen. Diese führen unter anderem zu einer Differenzierung und Aktivierung der myeloischen Vorläuferzellen (Hertel et al., 2003; Reeves et al., 2005a).

Im Genom von hCMV ist außerdem ein virales Homolog des humanen IL-10 enthalten, das in zwei verschiedenen Formen exprimiert wird. Während der produktiven Replikation wird *cmvIL-10* (Kotenko et al., 2000; Lockridge et al., 2000) und während der Latenzphase *latency-associated viral IL-10* gebildet (Jenkins et al., 2004). Diese IL-10-Homologe beeinflussen das Verhalten von T-Zellen und führen zu einer Modulation der Immunantwort (Spencer et al., 2002). Dieser Mechanismus könnte dem Virus dazu verhelfen, eine lebenslange latente Infektion zu etablieren. Dabei werden myeloische Zellen durch das Virus sowohl zur Dissemination als auch als für die Latenz verwendet. Makrophagen und Dendritische Zellen konnten beispielweise als Übertragungsquelle der hCMV-Infektion nach Transplantation solider Organe identifiziert werden (Mocarski et al., 2006; Reeves et al., 2005b).

3.2.7 Therapie

Als antivirale Substanzen stehen die Nukleosidanaloga Ganciclovir (GCV), Valganciclovir und Cidofovir und das Pyrophosphatanalogon Foscarnet zur Verfügung. Diese hemmen die hCMV-DNA-Polymerase und somit die Replikation des Virus. Eine Elimination des Virus ist hierdurch nicht möglich, da die episomale virale DNA persistiert. Nur die Virusreplikation wird verlangsamt bis unterbunden. Unter der Therapie können teils schwerwiegende Nebenwirkungen wie eine Myelotoxizität und eine Nephrotoxizität auftreten. Mit Ausnahme von Valganciclovir müssen alle Substanzen parenteral verabreicht werden. Untersuchungen zu Hyperimmunglobulin-Präparaten haben bei Patienten nach Organtransplantation, bei unreifen Neugeborenen mit Risiko für eine postnatale Infektion und bei Schwangeren gezeigt, dass gegenüber Placebo nur ein begrenzter oder nicht-existenter Nutzen vorlag (Snydman, 2001). Eine Impfung gegen hCMV existiert nicht. Die adoptive T-Zell-Immuntherapie wird im Rahmen experimenteller Therapieverfahren, aber nicht in der Routinetherapie eingesetzt.

3.3 Zielsetzung

Im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der IL-10-Zytokin-Familie sind die Effekte des Zytokins IL-26 noch weitgehend unbekannt. In Voruntersuchungen zeigte IL-26 in Zellkultur mit verschiedenen Modellviren sowohl pro- als auch antivirale Effekte. Diese Arbeit sollte die IL-26-bedingten Effekte auf hCMV in Zellkulturen primärer Fibroblasten untersuchen. Durch Analyse der Genexpression hCMV-infizierter Zellen sollten zudem Mechanismen der antiviralen Effekte von IL-26 identifiziert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Eukaryote Zelllinien

Name	Spezies	Zelltyp
Colo-205	Mensch	Kolonkarzinom
HFF	Mensch	primäre Vorhautfibroblasten

Tab. 2: Eukaryote Zelllinien mit Angabe der Spezies.

4.1.2 Zellkulturmedien und Zellkulturreagenzien

Abkürzung	Bezeichnung	Hersteller
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PAA, Pasching
DMEM, farblos	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Biochrom, Berlin
Accutase	Accutase	PAA
FKS	Fötales Rinderserum	PAA
Gln	L-Glutamin	PAA
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>	PAA
Pen/Strept	Penicillin/Streptomycin	PAA
Trypsin/ETDA	Trypsin/EDTA	Biochrom

Tab. 3: Zellkulturmedien und Zellkulturreagenzien zur Kultivierung der Zellen.

4.1.3 Oligonukleotide und Sonden

Nr.	Zielgen	Orientierung	Oligonukleotid (5'-3')	Produkt (bp)
Klonierung (TOPO-Vektor)				
2405	IFN- β 1	vorwärts	ACA TTC TAA CTG CAA CCT TT	840
2406	IFN- β 1	revers	TGA CTT TTG CAC CAA AAA TA	
2407	MxA	vorwärts	TCA AGA CAC TCA TCA AGA AG	1153
2408	MxA	revers	ATC AGG TGC TGA AAG ATC TC	
Quantitative RT-PCR				
2518	GAPDH	vorwärts	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	226
2519	GAPDH	revers	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	
2520	GAPDH	Sonde	FAM-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CCT-BBQ	
2562	IFN- β 1	vorwärts	CGC CGC ATT GAC CAT CTA TG	110
2563	IFN- β 1	revers	CAT TAG CCA GGA GGT TCT CAA CAA TA	
2564	IFN- β 1	Sonde	FAM-CCA GCC AGT GCT AGA TGA ATC TTG TCT GAA-BBQ	
2592	MxA	vorwärts	GAA AAC AAT TTT CAA GAA GGC CAT AA	125
2593	MxA	revers	TGT TTC ACG ATT GTC TCA AAT GTC C	
2594	MxA	Sonde	FAM-CCT GGC AGC TCT CTA CCA CGA TAC TGA-BBQ	

Nr.	Zielgen	Orientierung	Oligonukleotid (5'-3')	Produkt (bp)
RT-PCR				
2085	2'5'-OAS	vorwärts	TCA GAA GAG AAG CCA ACG TGA	400
2086	2'5'-OAS	revers	CGG AGA CAG CGA GGG TAA AT	
2371	GAPDH	vorwärts	GCA GGG GGG AGC CAA AAG GG	566
2372	GAPDH	revers	TGC CAG CCC CAG CGT CAA AG	
2312	IFN-β1	vorwärts	TGC TCT GGC ACA ACA GGT AG	376
2313	IFN-β1	revers	AGC CAG GAG GTT CTC AAC AA	
2337	IL-10R2	vorwärts	TAT TGG ACC CCC TGG AAT G	411
2338	IL-10R2	revers	GTA AAC GCA CCA CAG CAA G	
2331	IL-20R1	vorwärts	CTG TGT CTC TGG TGG TTT G	553
2332	IL-20R1	revers	CGC AGT AAA GAG TGT TCG G	
2339	IL-20R1	vorwärts	TCA AAC AGA ACG TGG TCC CAG TG	386
2440	IL-20R1	revers	TCC GAG ATA TTG AGG GTG ATA AAG	
2201	IRF-1	vorwärts	CTA AGA GCA AGG CCA AGA GGA A	483
2194	IRF-1	revers	GTA GAC TCA GCC CAA TAT CCC	
2089	ISG15	vorwärts	GGC TGG GAC CTG ACG GTG AAG	278
2090	ISG15	revers	CTG CTG CGG CCC TTG TTA TTC C	
2083	MxA	vorwärts	GCT ACA CAC CGT GAC GGA TAT GG	289
2084	MxA	revers	CGA GCT GGA CTG GAA AGC CC	
2087	PKR	vorwärts	GCC TTT TCA TCC AAA TGG AAT TC	301
2088	PKR	revers	GAA ATC TGT TCT GGG CTC ATG	
2266	SOCS-3	vorwärts	CGC GAA GGC TCC TTT GTG GA	350
2267	SOCS-3	revers	CAG CTT GCG CAC TGC GTT CA	
Sequenzierung				
M13	M13 pCR 2.1	vorwärts	GTA AAA CGA CGG CCA GTG	
M13	M13 pCR 2.1	revers	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CC	

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide und Sonden. (Biomers, Ulm oder TIB MOLBIOL, Berlin).

4.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Benzonase (Endonuklease)	Merck, Darmstadt
DNase I, rekombinant, RNase-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Reverse Transkriptase (RT), Superscript II	Life Technologies, Darmstadt
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboLock RNase-Inhibitor	Fermentas

Tab. 5: Liste der verwendeten Enzyme.

4.1.5 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklease	Hersteller
XhoI	Fermentas
BamHI	Life Technologies
HindIII	Life Technologies

Tab. 6: Liste der verwendeten Restriktionsendonukleasen.

4.1.6 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Rekombinantes humanes IL-26	eigene Arbeitsgruppe
Rekombinantes humanes IFN- α	R&D Systems, Minneapolis, MN
Rekombinantes humanes IL-2 (Proleukin®)	Chiron, Emeryville, CA
Hexadimethrinebromid (Polybren®)	Sigma Life Science, St. Louis, MO

Tab. 7: Liste der verwendeten Reagenzien.

4.1.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Primäre Antikörper		
Anti- β -Actin (Klon 13E5; Nr. 4970)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Anti-pSTAT-3, phospho-Tyr705 (Nr. 9131)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Anti-pSTAT-1, phospho-Tyr701 (Nr. 9171)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Anti-STAT-3 (Nr. 9132)	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Anti-CMVp52 (CCH2, N1527)	Maus	DakoCytomation, Hamburg
Anti-pp72 monoklonaler Antikörper	Maus	Michael Winkler, Kiel
Anti-pp65 monoklonaler Antikörper	Maus	Michael Winkler, Kiel
Sekundäre Antikörper		
Anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-konjugiert	Schwein	DakoCytomation
Anti-Maus-IgG, Peroxidase-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg
Seren		
polyklonales Anti-IL-26-Serum	Kaninchen	eigene Arbeitsgruppe (Knappe et al., 2000)

Tab. 8: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und der Immunsereen.

4.1.8 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Durchflusszytometrie	
Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	4 g (w/v) Paraformaldehyd in 100 ml PBS mit NaOH gelöst (pH 7)
Durchflusszytometrie-Puffer	5 % (v/v) FKS, 0,1 % Natriumazid in PBS
SDS-PAGE	
10 % APS	1 g Ammoniumperoxodisulfat (APS) ad 10 ml H ₂ O
8-15 % Trenngel-Lösung	1,1-2,3 ml H ₂ O; 1,3-2,5 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid; 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 50 µl 10 % SDS; 50 µl 10 % APS; 2-3 µl Tetramethylethylen-diamin (TEMED)
5 % Sammelgel-Lösung	2,1 ml H ₂ O; 0,5 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid; 0,38 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 30 µl 10 % SDS; 30 µl 10 % APS; 3 µl TEMED
5x Proteinlaufpuffer	37,75 g Tris; 235 g Glycin; 125 ml 10 % SDS; H ₂ O ad 2,5 l; pH 8,3
2x Probenpuffer	1 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 4 ml 10 % SDS; 2 ml Glycerin; 2 ml 0,1 % Bromphenolblau (BPB)-Lösung; 1 ml β-Mercaptoethanol (14,3 M)
Lysepuffer	1 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 4 ml 10 % SDS; 2 ml Glycerin; 2 ml 0,1 % BPB-Lösung; 1 ml β-Mercaptoethanol (14,3 M); 1 µl Benzonase ad 1 ml
Agarosegelelektrophorese	
10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	90 mM Tris-HCl; 890 mM Borsäure; 25 mM EDTA; pH 8,0
1x TBE-Puffer mit Ethidiumbromid	1x TBE mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid
10x DNA-Auftragspuffer	5 ml 100 % Glycerin; 4,8 ml H ₂ O; 200 µl 0,5 M EDTA; 25 mg BPB
Agarosegel	0,8-2 % (w/v) Agarose in 1xTBE
Immunoblot	
10x Transferpuffer	144,2 g Glycin; 30,3 g Tris; H ₂ O ad 1 l
1x Transferpuffer	10 ml 10x Transferpuffer; 10 ml Methanol; 80 ml H ₂ O
1x Tris-buffered saline (TBS)	30 ml 5 M NaCl, 5 ml 2 M Tris-HCl pH 7,5 ad 1 l H ₂ O
1x TBS mit 0,05% Tween 20	5 ml 10 % Tween 20; 995 ml 1x TBS
20x Phosphate-buffered saline (PBS)	320 g NaCl, 46 g Na ₂ HPO ₄ , 8 g KCl, 40 g KH ₂ PO ₄ ad 2 l H ₂ O
Blockierpuffer (M-TBS)	5 % Magermilchpulver in 1x TBS mit 0,05 % Tween 20
denaturierender Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol
Chemolumineszenz-System	Super Signal West Femto Maximum Sensitivity und Super Signal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)

Tab. 9: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Als für hCMV permissive Zellen wurden primäre Fibroblasten verwendet, die aus Vorhäuten anonymer Spender (Säuglinge und Kleinkinder) gewonnen wurden. Zur Überprüfung der Aktivität von IL-26 wurde die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Colo-205 verwendet, die den IL-26R funktionell exprimiert. Die Zellen wurden in einem Kulturmedium aus DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Rinderserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Bei Auswertung der Experimente im Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-

Photometer (Fluorimeter) wurde statt rotem DMEM farbloses DMEM verwendet. Die Zellkulturen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert (Tab. 2, 3).

Für die Infektionsexperimente wurde hCMV mit einem genomisch integrierten Gen für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) verwendet (Marschall et al., 2000). Zur Amplifikation des Virus und Erstellung eines Virusstocks erfolgte die Kultivierung auf primären Fibroblasten für 8 d. Nach lichtmikroskopisch beobachteter, nahezu vollständiger Zerstörung, wurden die Zellkulturüberstände abgezogen und der Virustiter wurde im Fluoreszenzmikroskop anhand der Anzahl fluoreszierender Zellen ebenfalls auf primären Fibroblasten in 96-*well*-Zellkulturplatten in Quadruplikaten bestimmt. Der englische Begriff *well* beschreibt standardisierte Mikrotiterplatten mit einer vorgegebenen Anzahl von Vertiefungen, welche als Reaktionsgefäße genutzt werden. Der Virustiter betrug 1×10^6 *plaque-forming-unit* /ml (Plaque-bildende Einheit, pfu/ml). Die Überstände wurden bei -80°C eingefroren und unmittelbar zum Gebrauch aufgetaut. Außerdem kam humanes HSV-1 mit einem ebenfalls genomisch integrierten GFP-Gen zur Anwendung (Arthur et al., 2001).

Alle Infektionsexperimente mit hCMV und HSV-1 wurden mit primären Fibroblasten durchgeführt. Verwendung fanden ausschließlich Zellen in niedrigen Passage-Zahlen (maximal Passage 18). Für die Experimente wurden die Zellen in 96-*well*, 24-*well*, 6-*well* oder 9-cm-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zellzahlen wurden so gewählt, dass die Zellen für das Experiment Konfluenz ausgebildet hatten.

Für die Versuche wurde nun das Kulturmedium abgezogen und durch frisches Medium oder in Medium gelöstes IL-26 in den Konzentrationen 25, 5, oder 2,5 µg/ml, IL-26-Dialysepuffer, 0,05 mM Ganciclovir, Polybren oder humanes rekombinantes IL-2 ersetzt (Tab. 7). Nach etwa 5 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte nun die Zugabe von hCMV mit einer *multiplicity of infection* (MOI) zwischen 0,3 bis 0,001. Die MOI gibt hierbei das Verhältnis zwischen dem Virustiter und der Anzahl der Zielzellen an. Für die Infektionsexperimente mit HSV-1 wurde ebenfalls eine MOI = 0,003 gewählt. Die infizierten Zellen wurden anschließend wie oben beschrieben bei 37°C inkubiert.

4.2.2 Inhibitionsexperimente durch polyklonales Anti-IL-26-Serum

Mit einem IL-26-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Serum (Knappe et al., 2000) wurde versucht, den Effekt von IL-26 auf die hCMV-Infektion zu blockieren. Hierzu wurde IL-26 zusammen mit dem Serum in einer Verdünnung von 1:100 für 20 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler inkubiert. Zur Kontrolle wurde PBS verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit dem Reaktionsansatz vorbehandelt und nach 5 min Vorinkubation mit

hCMV (MOI = 0,003) infiziert. Die Zellen wurden an d 6 p.i. in 2 % PFA fixiert und die Anzahl GFP-positiver Zellen wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt.

4.2.3 RNA-Präparation

Primäre Fibroblasten wurden auf 9-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte nach lichtmikroskopischer Kontrolle die Behandlung mit IL-26 oder IL-2 in den Dosierungen 25 und 5 µg/ml, Polybren 2,5 µg/ml, IFN-α 1000 U/ml und Medium. Die Zellen wurden anschließend mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert. Nach 6 und 24 h p.i. wurden Gesamt-RNA-Proben gewonnen. Die Zellkulturüberstände wurden abgezogen und die Zellen in 1,5 ml Trizol (Life Technologies) aufgenommen, homogenisiert und in Reaktionsgefäße überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,3 ml Chloroform. Nach Vermengen wurden die Proben für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 15.000 U/min für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Phasenseparation wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, zur weiteren Präparation in neue Reaktionsgefäße überführt. Hiernach erfolgte die Zugabe von 0,75 ml Isopropanol und eine erneute Zentrifugation wie oben beschrieben. Die Überstände wurden nun vorsichtig abgezogen und das entstandene Sediment in 1,5 ml 75 % Ethanol gewaschen. Die Proben wurden danach bei 8.000 U/min für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden erneut entfernt und die Proben nach Lufttrocknung in RNase- und DNase-freiem Wasser resuspendiert. Zum Ausschluss einer Verunreinigung mit DNA erfolgte ein Verdau der gewonnenen RNA-Proben mit dem Enzym DNase I (Tab. 5). Der Reaktionsansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 70 µl mit 3 µl des Enzyms und 20 µl des Reaktionspuffers, aufgefüllt mit H₂O. Die Proben wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und die DNase I anschließend bei 75°C für 10 min hitzeinaktiviert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte in einem Biophotometer (Eppendorf) und durch Zugabe einer vorher berechneten Menge H₂O wurde die RNA-Konzentration angeglichen. Danach wurde die RNA über eine Säule (RNeasy, Cleanup, Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl RNase-freiem H₂O suspendiert.

4.2.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der gewonnenen RNA-Proben wurde mit dem Enzym RT Superscript II durchgeführt. Hierzu wurden zunächst je Reaktionsansatz 1 µl oligo(dT)₁₂₋₁₈-Oligonukleotide in einer Konzentration von 500 µg/ml mit 1 µl 10 mM Desoxyribonukleotid-Triphosphaten vermengt. Nach der Inkubation über 5 min bei 65°C wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert. Als nächstes wurden 4 µl 5x Erst-Strang-Puffer, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol und 1 µl RiboLock RNase-Inhibitor (40 U/µl) zugegeben. Nach 2 min Inkubation bei 42°C wurde 1 µl der Reversen Transkriptase Superscript II hinzugegeben. Zur Detektion von Verunreini-

gungen mit genomischer DNA erfolgte pro Probe je ein Ansatz mit und ohne Reverser Transkriptase. Nun wurden die Proben für 50 min bei 42°C inkubiert und das Enzym hiernach für 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert. Die entstandenen cDNA-Proben wurden bei -25°C gelagert.

4.2.5 Durchflusszytometrie

Die Versuche wurden in 24-*well*-Kulturplatten durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Zellkulturüberstände abgezogen und teilweise in Reaktionsgefäße umgefüllt, die bei -80°C zur Titration der Viruslast eingefroren wurden. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 0,5 ml PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen mit jeweils 80-230 µl Trypsin (Biochrom) oder Accutase (PAA) bei 37°C inkubiert, bis unter lichtmikroskopischer Kontrolle die Zellen nicht mehr adhären waren. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung mit 0,5 ml PBS und Überführung in Reaktionsgefäße. Diese wurden für 6 min bei 4.200 U/min und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig entfernt und die Zellen mit 180 µl 2 % PFA resuspendiert und dadurch fixiert (Tab. 9).

Als Durchflusszytometer wurde das Gerät Canto I (Becton-Dickinson, Heidelberg) verwendet. Die aus der GFP-Expression von HSV-1 und hCMV resultierende Fluoreszenz wurde gemessen. Als Einstellungen für das Vorwärtsstreulicht wurden 25 bzw. 50 nm, für das Seitwärtsstreulicht 350 bzw. 450 nm und für die grüne Fluoreszenz 320 bzw. 420 nm gewählt. Die Geräteeinstellungen wurden so getroffen, dass sich eine homogene Verteilung der gemessenen Zellen ergab. Zelltrümmer wurden durch das Setzen einer Markierung um die Hauptzellpopulation aus der Messung ausgeschlossen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FCS-Express (Version 3, De Novo Software, Los Angeles, CA). Zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der primären Fibroblasten erfolgte jeweils eine *Mock*-Infektion. Die *Mock*-Infektion ist eine Scheininfektion, bei der die Zellen in gleicher Weise behandelt werden wie die anderen Zellen, ohne dass jedoch eine Infektion mit dem Virus stattfindet. Die Ergebnisse der Eigenfluoreszenzmessung wurden dabei auf 1 % adjustiert. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen wurde in % der Gesamtanzahl der gemessenen Zellen angegeben. Graphisch erfolgte eine Darstellung der gemessenen Zellen in Dichtedarstellungen.

4.2.6 Virustitration

Die Titration der hCMV-Konzentration erfolgte in 96-*well*-Kulturplatten auf primären Fibroblasten, die am Vortag ausgesät und über Nacht inkubiert wurden. Als Proben wurden Kulturüberstände verwendet, die in Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C eingefroren wurden. Diese wurden unmittelbar vor der Titration aufgetaut. Verdünnungsreihen in Zehnerpotenz-Schritten von 10^0 bis 10^{-3} wurden erstellt. Die Auswertung wurde in Quadruplikaten vorge-

nommen und erfolgte nach 3 d mit dem Fluoreszenzmikroskop IX81 (Olympus, Tokio, Japan). Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen pro Vertiefung der 96-*well*-Kulturplatte wurde ausgezählt und der Virustiter in pfu/ml bestimmt.

4.2.7 Enzymimmuntest für Interferon- β

Primäre Fibroblasten wurden in 24-*well*-Kulturplatten in FKS-freiem Medium ausgesät und inkubiert. Nach Infektion der Zellen mit hCMV (MOI = 0,03) wurden die Kulturüberstände nach 6, 24 und 48 h p.i. in Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Das VeriKine Human Interferon Beta *enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA)-Kit wurde verwendet (PBL InterferonSource, Piscataway, NJ). Zunächst wurde nach Instruktion des Herstellers eine Standardkurve von 50 bis 100.000 pg/ml erstellt. Pro *well* wurden nun 50 μ l des Probenverdünners und 50 μ l des Zellkulturüberstandes bzw. des erstellten Standards gemischt und nach Versiegelung der Platte für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit verdünnter Waschlösung. Danach wurden je 100 μ l der Antikörperlösung zugegeben und die Proben, wie oben beschrieben, erneut inkubiert und gewaschen. Darauf folgte die Zugabe von 100 μ l Meerrettich-Peroxidase-Lösung und eine erneute Inkubation und Waschung. Als nächstes wurden je 100 μ l Substrat zugefügt und die Proben im Dunkeln für 15 min inkubiert. Die entstandene Farb-reaktion wurde mit 100 μ l Stopp-Lösung beendet. In einem Safire 2 Mikrotiterplatten-Fluorimeter (Tecan, Männedorf, Schweiz) wurde die optische Dichte bei einer Anregungsfrequenz von 450 nm ausgewertet.

4.2.8 Mikrotiterplatten-Fluorimetrie

Als Kulturmedium kam farbloses DMEM mit 5 % FKS und Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin in oben genannten Konzentrationen zum Einsatz. Die Versuche wurden mit primären Fibroblasten, welche am Vortag in 96-*well*-Kulturplatten ausgesät wurden, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte jeweils in Quadruplikaten. Damit ein möglicher HSV-1-unabhängiger Einfluss der verwendeten Reagenzien auf die gemessene GFP-bedingte Fluoreszenz, welche als optische Dichte (OD) angegeben wurde, erfasst werden konnte, wurde neben der HSV-1-Infektion auch eine Mock-Infektion durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Quantifizierung der mitochondrialen Aktivität und somit indirekt der Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen die Proben pro *well* mit 50 μ l einer 1:10 verdünnten Lösung von *water-soluble tetrazolium* (WST)-1 behandelt. Mit dem Safire 2 Mikrotiterplatten-Fluorimeter wurde die Fluoreszenz der Proben in der Einstellung für Fluorescein bei einer Exzitationswellenlänge von 483 nm und einer Emissionswellenlänge von 425 nm gemessen. Die eingestellte Band-

breite betrug 20 nm. Für die Absorptionsmessung mit WST-1 wurde eine Messwellenlänge von 450 nm und eine Referenzwellenlänge von 690 nm gewählt.

4.2.9 Immunblot

Im Immunblot wurden die zellulären Proteine pSTAT-1, STAT-3, pSTAT-3, und β -Actin und die hCMV-Proteine pp72, pp65 und pp52 in Lysaten hCMV-infizierter primärer Fibroblasten untersucht. Hierzu wurden die hCMV-infizierten Zellen nach Abziehen des Zellkulturüberstandes in jeweils 120 ml 2x SDS-Lysepuffer mit 0,12 μ l Benzonase aufgenommen (Tab. 5), in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend 30 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben für 10 min auf 95°C erwärmt und bis zur Verwendung bei -25°C eingefroren. Die Auftrennung der Proteine erfolgte je nach Größe der Zielproteine in 8-10 % SDS-PAGE mit 5 %-igem Sammelgel in SDS-Proteinlaufpuffer (Tab. 9) im Vergleich zu einem Größenstandard (Page Ruler, Fermentas).

Als nächstes erfolgte die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine für 2 min in Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore) in dem Halbtrocken-Verfahren. Hierzu wurden mit 1x Transferpuffer getränkte Filter-Papiere (Whatman) verwendet. Im nächsten Schritt erfolgte das Blockieren der PVDF-Membran in M-TBS-Blockierpuffer bei 4°C. Mit 1x TBS-Puffer wurde die Membran nun einmal gewaschen und in einem Folienschlauch in 1x TBS mit 5 % bovinem Serumalbumin und dem Primärantikörper gegen das entsprechende Zielprotein über Nacht auf einem mechanischen Rüttler bei 4°C inkubiert (Tab. 8, 9). Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper in M-TBS-Puffer hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Nach erneuter Behandlung mit 1x TBS-Puffer erfolgte die Auswertung mit einer CCD-Kamera (LAS 3000, Fuji, Tokio, Japan). Als Entwicklerlösung wurde eine Zielprotein-spezifische Kombination aus Super Signal West Femto Maximum Sensitivity mit Super Signal West Pico Chemilumineszenz Substrat im Mischungsverhältnis 1:10 verwendet. In denaturierendem Waschpuffer wurden die verwendeten Antikörper bei 56°C für 20 min von der PVDF-Membran entfernt. Nach erneutem Waschen in 1x TBS-Puffer und Blockieren mit M-TBS konnte nun nach dem beschriebenen Verfahren eine erneute Markierung der Zielproteine mittels Primärantikörpern erfolgen.

4.2.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation aus cDNA-Proben in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem T3-Thermocycler durchgeführt (Biometra, Göttingen). Die Anlagerungstemperatur wurde in Abhängigkeit von der Sequenz der verwendeten *Primer* gewählt. Als *Primer* werden dabei Oligonukleotide zum Starten einer Polymerase-Kettenreaktion bezeichnet (Tab. 4). Die

Temperaturen wurden mit der Formel $T_m (^{\circ}\text{C}) = (2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C))$ berechnet; in der Regel wurde für die Amplifikation die um 5°C unterschrittene T_m verwendet. Die Anzahl der Zyklen wurde in Abhängigkeit vom DNA-Gehalt der Proben und dem zu amplifizierenden Zielgen variiert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und der Programm-Einstellungen wurde wie folgt gewählt (Tab. 5, 10, 11):

Reaktionsansatz	µl
10x (NH ₄) ₂ SO ₄ -Taq-Puffer (Fermentas)	5
MgCl ₂ 2 mM (Fermentas)	4
dNTP-Mischung 0,2 mM (Fermentas)	1
Oligonukleotid vorwärts 1-2 µM	1
Oligonukleotid revers 1-2 µM	1
Taq-DNA-Polymerase 1U (Fermentas)	1
cDNA	2
H ₂ O (DNase, RNase frei)	ad 50

Tab. 10: Reaktionsansatz für die Polymerase-Kettenreaktion.

Programmeinstellungen	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95°C	2 min
Denaturierung	95°C	30 s
Anlagerung	$T_m - 5^{\circ}\text{C}$	30 s
Elongation	72°C	1-3 min
abschließende Elongation	72°C	5 min

Tab. 11: Programmeinstellungen für die Polymerase-Kettenreaktion.

4.2.11 Quantitative-PCR

Die relevanten DNA-Abschnitte für die Zielgene IFN-β und MxA wurden zur Erstellung einer Standardkurve für die quantitative-PCR in TOPO-Vektoren kloniert. Hierzu wurde zunächst aus gewonnenen RNA-Proben über einen Temperaturgradienten eine One-step RT-PCR (Life Technologies) mit 40 Zyklen und Annealing-Temperaturen zwischen 48-58°C durchgeführt. Der Reaktionsansatz und die Programmeinstellungen wurden wie folgt gewählt (Tab. 12, 13):

Reaktionsansatz	µl
2x Reaktionsmix	12,5
Vorwärts-Primer 1-2 µM	1,5
Reverser Primer 1-2 µM	1,5
RT-Polymerase	1,0
DMSO	0,25
H ₂ O (DNase-, RNase-frei)	8,25
cDNA	1,0

Tab. 12: Reaktionsansatz der PCR zur Klonierung in einen TOPO-Vektor.

Programmeinstellungen	Temperatur	Zeit
Hitzeaktivierung	50°C	1h
initiale Denaturierung	94°C	2 min
Denaturierung	94°C	15 s
Anlagerung	48°C-58°C	30 s
Elongation	68°C	90 s
abschließende Elongation	68°C	4 min

Tab. 13: Programmeinstellungen für die PCR zur Klonierung in einen TOPO-Vektor.

Anschließend wurde die cDNA in einem 0,8 % Agarosegel für 60 min bei 130 V und 400 mA aufgetrennt (Tab. 9). Die erhaltenen Banden mit der erwarteten Fragmentgröße wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren) wurde die DNA aufgereinigt. Mit Taq-Polymerase wurden die Proben bei 72°C für 15 min im Thermocycler inkubiert, damit sie im nächsten Schritt nach Anleitung des Herstellers direkt in den Plasmidvektor TOPO-Vektor 2.1 (Life Technologies) eingefügt werden konnten.

Die kompetenten Bakterien *Escherichia coli* DH5α (Life Technologies) wurden mit den hergestellten Plasmiden chemisch transformiert und die Plasmide in den Bakterien vervielfältigt. Mit den Oligonukleotiden M13 vorwärts und M13 revers wurde eine Sanger-Sequenzierung zur Überprüfung des inserierten DNA-Abschnittes angefertigt. Die Ausführung erfolgte auf Geräten des Instituts für klinische Molekularbiologie der CAU zu Kiel mit den Reagenzien BigDye v3.1 der Firma Applied Biosystems (Life Technologies). Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Programm Vector NTI (Life Technologies). Die Plasmide wurden über eine Anionenaustausch-Säule (Maxi-Präparation, Qiagen) aufgereinigt.

Die Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamH1 und HindIII (Tab. 6) über Nacht bei 37°C inkubiert und durch den Verdau linearisiert. Zur Kontrolle des vollstän-

digen Verdau erfolgte ein zweiter Verdau mit der Restriktionsendonuklease XhoI und die anschließende Auftrennung in einem Agarosegel.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Anzahl der Kopien/ μl mit der Formel $x \text{ g}/\mu\text{l DNA}/(\text{Plasmid-DNA-Länge (bp)} * 660) * 6,022 * 10^{23}$ berechnet. Jeweils wurde eine 1:10 verdünnte Standardreihe von $2x 10^0$ bis $2x 10^9$ Kopien/ μl erstellt. Die relative Expression der Gene IFN- β 1 und MxA wurde bezogen auf das Zellhaushaltsgen GAPDH ausgewertet. Für die quantitativen-PCR-Untersuchungen wurde RNA von hCMV-infizierten primären Fibroblasten in 9-cm-Zellkulturschalen wie oben beschrieben gewonnen und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Proben wurden nach 6 und 24 h p.i. gewonnen. Als Vergleichsprotein zu IL-26 wurde humanes rekombinantes IL-2 verwendet. Zur Detektion wurden fluoreszenzmarkierte Sonden zusammen mit dem QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen) verwendet. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem LightCycler-1.5 (Roche Diagnostics) durchgeführt. Der Reaktionsansatz und die Programmeinstellungen wurden wie folgt gewählt (Tab. 14, 15):

Reaktionsansatz	μl
2x QuantiTect Probe PCR Master Mix	10,0
Primer vorwärts 0,5 μM	0,5
Primer revers 0,5 μM	0,5
Sonde 0,25 μM	0,5
H ₂ O (DNase-, RNase-frei)	3,5
Probe (cDNA, Plasmid-Standard oder H ₂ O)	5,0

Tab. 14: Reaktionsansatz für die quantitative-PCR.

Programmeinstellungen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	15 min
Denaturierung	95°C	2 s
Anlagerung und Elongation	60°C	60 s
Abschließende Kühlung	40°C	30 s

Tab. 15: Programmeinstellungen für die quantitative-PCR.

Die Reagenzien wurden nach dem Durchmischen in Glaskapillaren pipettiert. Als Negativkontrolle wurde statt der cDNA-Probe oder des Plasmid-Standards 5 μl H₂O verwendet. Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit dem *relative-expression software tool* (Pfaffl et al., 2002). Die Zielgene IFN- β 1 und MxA wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert.

4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Messwerte erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel 2007. Berechnet wurden Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch Bestimmung des p-Wertes mit dem gepaarten Zwei-Stichproben T-Test nach Student ermittelt. Messwerte mit einem p-Wert $<0,05$ wurden als signifikant betrachtet. In den graphischen Darstellungen wurden p-Werte $<0,05$ mit *, $<0,01$ mit ** und $<0,001$ mit *** gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Der Einfluss von IL-26 auf die Virusinfektion

Alle Infektionsexperimente erfolgten in Kulturen humaner primärer Fibroblasten. Zur Anwendung kamen Virusrekombinanten des hCMV (Marschall et al., 2000) und des HSV-1 (Arthur et al., 2001), welche beide ein genomisch integriertes GFP-Gen tragen und nach Infektion zytosolisches GFP bilden. Die fluoreszierenden Eigenschaften des GFP wurden zur Auswertung der Experimente genutzt. GFP-exprimierende Zellen wurden als virusinfiziert gewertet. Der Einfluss von IL-26 auf die Virusinfektion wurde durch Fluoreszenzmikroskopie, Mikrotiterplatten-Fluorimetrie, Durchflusszytometrie und Virustitration in Kulturen primärer Fibroblasten untersucht.

Primäre Fibroblasten wurden mit Medium, dem IL-26-Dialysepuffer, IL-26 und dem Vergleichsprotein IL-2 in verschiedenen Konzentrationen vorbehandelt. Als weitere Vergleichssubstanz und Positivkontrolle für einen antiviralen Effekt wurde das Nukleosidanalogon GCV verwendet. Nach Vorinkubation der Fibroblasten über 5 min wurden die Zellen mit hCMV mit $MOI = 0,003$ infiziert und über mehrere Tage bei $37^{\circ}C$ inkubiert. An d 4, 5 und 6 p.i. erfolgte die Auswertung der Infektionsexperimente mittels Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und Virustitration.

In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wiesen nach Behandlung mit IL-26 in ansteigender Konzentration weniger Zellen eine GFP-bedingte Fluoreszenz nach viraler Infektion im Vergleich zu Medium auf. Der IL-26-Dialysepuffer hatte keinen Einfluss auf die Anzahl virusinfizierter Zellen. Auch nach Vorbehandlung mit IL-2 ließ sich bei den verwendeten Konzentrationen kein Einfluss auf die Virusinfektion nachweisen. GCV führte erwartungsgemäß zu einer starken Verminderung der Fluoreszenz, welche den Effekt von IL-26 noch übertraf (Abb. 2).

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich analog zu den Beobachtungen in der Fluoreszenzmikroskopie eine Konzentrations-abhängige Reduktion der Anzahl GFP-positiver, virusinfizierter Zellen nach Vorbehandlung mit IL-26 im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der Effekt war bei einer Zytokinkonzentration von $25 \mu g/ml$ am stärksten ausgeprägt und nahm mit sinkender Konzentration ab. Die Anzahl der virusinfizierten Zellen war dabei von d 4 bis 6 p.i. signifikant vermindert. Unter Verwendung von GCV war die Anzahl der virusinfizierten Zellen ebenfalls signifikant reduziert. An d 4 p.i. war die Stärke des IL-26-Effektes in der höchsten verwendeten Konzentration vergleichbar mit der von GCV. Jedoch waren an d 5 und 6 p.i. nach Vorbehandlung mit IL-26 mehr Zellen infiziert als bei Verwendung von GCV. Der IL-26-Dialysepuffer und IL-2 hatten keinen Einfluss auf die Anzahl GFP-positiver Zellen (Abb. 3).

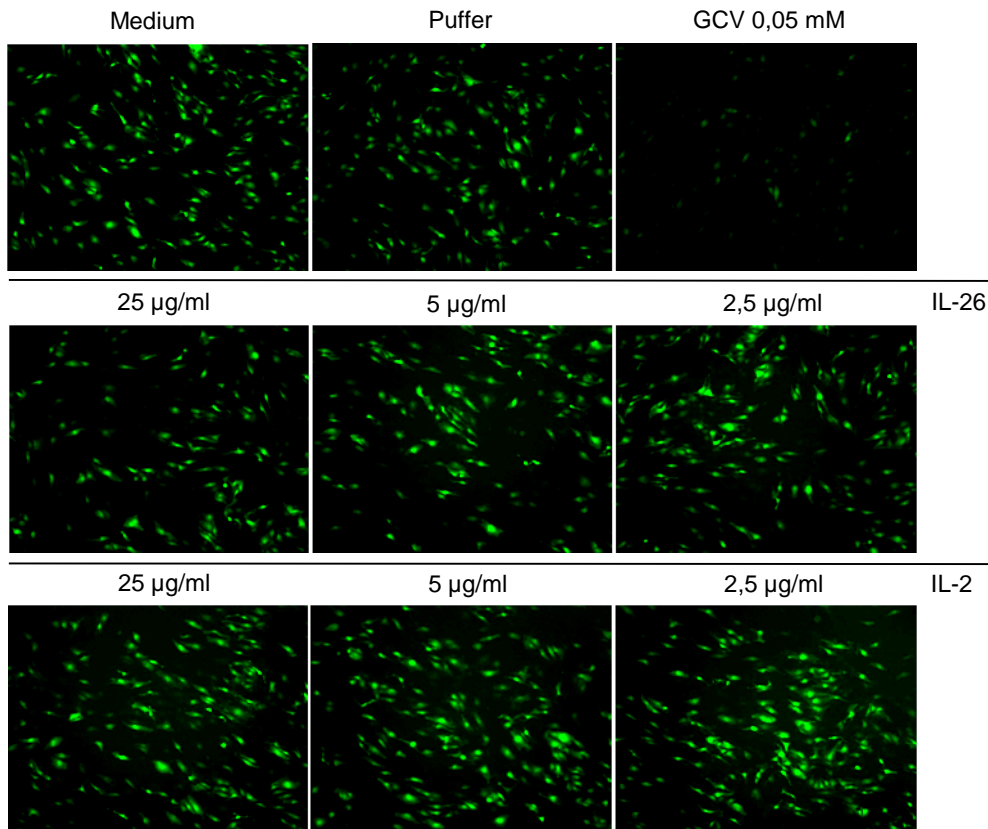


Abb. 2: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung virusinfizierter primärer Fibroblasten. Primäre Fibroblasten wurden mit IL-26 oder IL-2 in den Konzentrationen 25, 5 und 2,5 µg/ml, Medium, IL-26-Dialysepuffer oder als Positivkontrolle mit GCV in einer Konzentration von 0,05 mM über 5 min vorbehandelt und anschließend mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert. Nach Inkubation über 6 d wurde die GFP-bedingte Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

Zur Bestätigung des beobachteten antiviralen IL-26-Effektes wurden parallel zu den für die Durchflusszytometrie durchgeführten Experimenten die Zellkulturüberstände asserviert. In einer Virustitration auf primären Fibroblasten wurde anschließend der Virustiter in pfu/ml bestimmt (Abb. 4). IL-26 führte zu einer signifikanten, Konzentrations-abhängigen Reduktion der Anzahl infektiöser Viruspartikel in Vergleich zu Medium. Der IL-26-Dialysepuffer hatte keinen Einfluss auf die Virusinfektion. An d 5 p.i. konnte für IL-2 bei 25 µg/ml eine signifikante Reduktion des Virustiters detektiert werden. Dieser Effekt war jedoch weder an d 4 noch an d 6 p.i. nachweisbar. Im Gegenteil führte IL-2 in niedrigen Konzentrationen an d 6 p.i. sogar zu einer signifikanten Zunahme des Virustiters gegenüber der Mediumkontrolle. Bei Verwendung von GCV wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen. Die Ergebnisse aus den Voruntersuchungen konnten durch die Virustitration bestätigt werden.

IL-26 führte somit Konzentrations-abhängig zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl hCMV-infizierter primärer Fibroblasten. Das Vergleichszytokin IL-2 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Anzahl virusinfizierter Zellen.

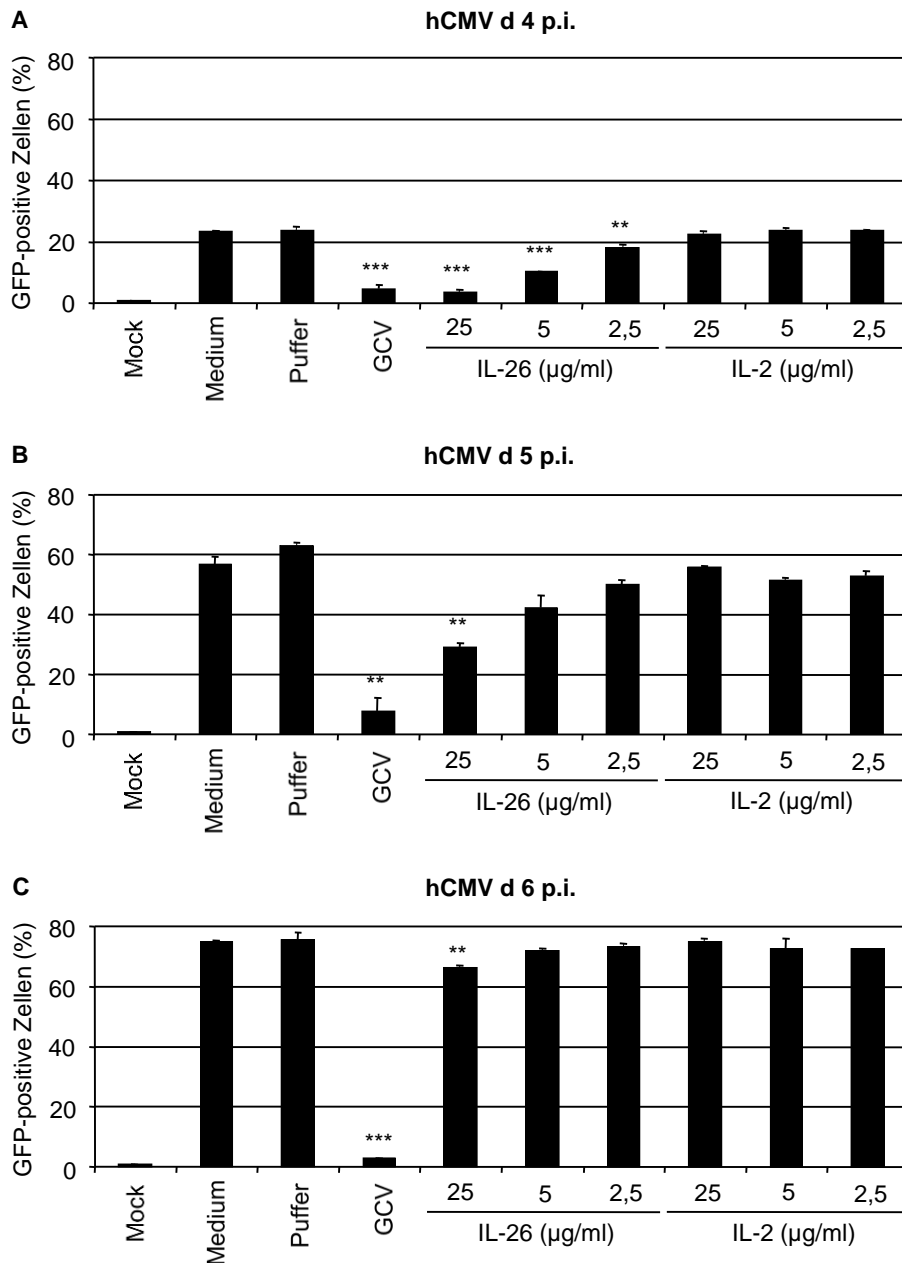


Abb. 3: Antiviraler Effekt von IL-26 auf hCMV in der Durchflusszytometrie. Nach Vorbehandlung von primären Fibroblasten mit IL-26 und IL-2 in verschiedenen Konzentrationen wurden diese mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten in 2% PFA fixiert. Die Anzahl der GFP-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrollen wurden Medium, IL-26-Dialysepuffer und GCV in einer Konzentration von 0,05 mM verwendet. A) zeigt d 4 p.i., B) d 5 p.i. und C) d 6 p.i.

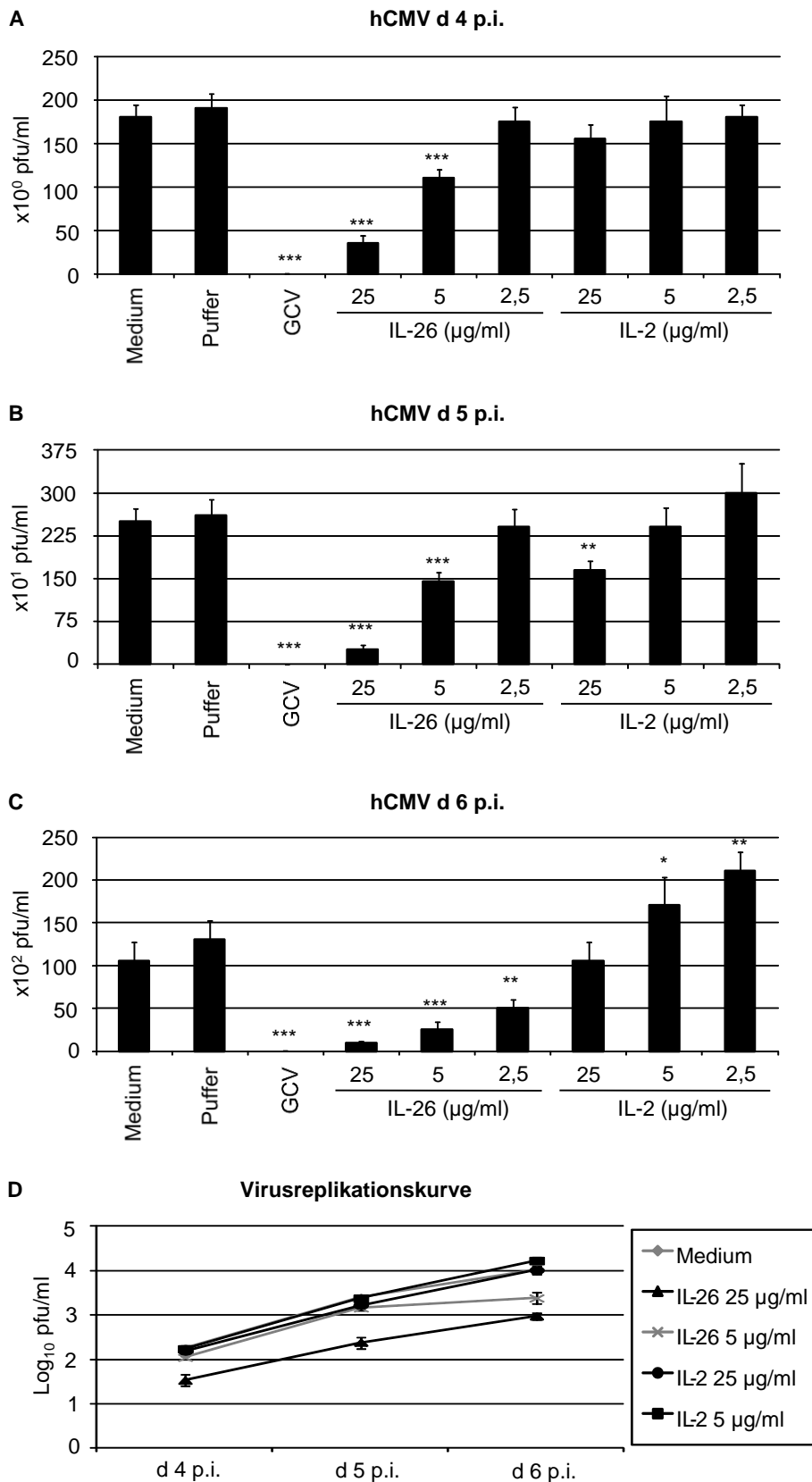


Abb. 4: Antiviraler Effekt von IL-26 auf hCMV in der Virustitration. Zellkulturüberstände mit verschiedenen Konzentrationen an IL-26 und IL-2 vorbehandelten primären Fibroblasten wurden nach Infektion mit hCMV (MOI = 0,003) zu definierten Zeitpunkten gewonnen. Die Titration erfolgte auf primären Fibroblasten. Der Virustiter wurde an d 3 p.i. mittels Fluoreszenzmikroskopie anhand der GFP-Fluoreszenz in pfu/ml bestimmt. Als Kontrollen wurden Medium, IL-26-Dialysepuffer und GCV in einer Konzentration von 0,05 mM verwendet. A) zeigt d 4 p.i., B) d 5 p.i., C) d 6 p.i., D) zeigt die logarithmische Virusvermehrungskurve von d 4-6 p.i.

5.2 Abhängigkeit des IL-26-Effektes von der Infektionsmultiplizität

Im Weiteren wurde die Ausprägung des antiviralen IL-26-Effektes in Abhängigkeit von der verwendeten MOI untersucht. Dazu wurden die primären Fibroblasten mit Medium oder IL-26 für 5 min vorbehandelt und anschließend mit hCMV in verschiedenen MOIs infiziert. Die Anzahl GFP-positiver, virusinfizierter Zellen wurde dann an d 4 oder 5 p.i. durchflusszytometrisch bestimmt. MOIs zwischen 0,3 und 0,001 wurden verwendet. Bei hohen MOIs von 0,3 bis 0,03 war in der Auswertung kein Unterschied zwischen IL-26 und Medium zu verzeichnen. Jedoch ließ sich bei verwendeten MOIs < 0,01 eine signifikante Reduktion der Anzahl virusinfizierter Zellen messen. Die Stärke des antiviralen Effektes nahm dabei mit sinkender MOI zu (Abb. 5, 6).

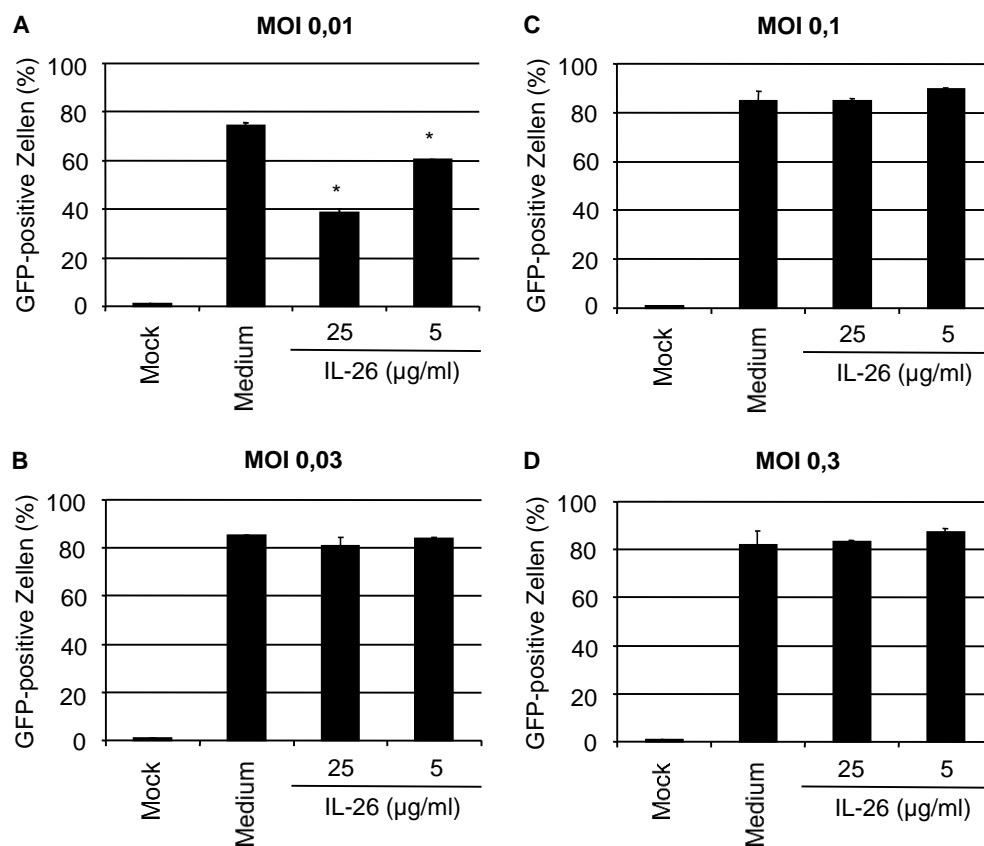


Abb. 5: Abhängigkeit des IL-26-Effektes von der verwendeten MOI (0,3-0,01). Die Zellen wurden mit IL-26 über 5 min vorbehandelt und anschließend mit hCMV in verschiedenen MOIs infiziert. An d 4 p.i. wurden die Zellen in 2% PFA fixiert und die Anzahl der GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. A) MOI = 0,01, B) MOI = 0,03, C) MOI = 0,1, D) MOI = 0,3.

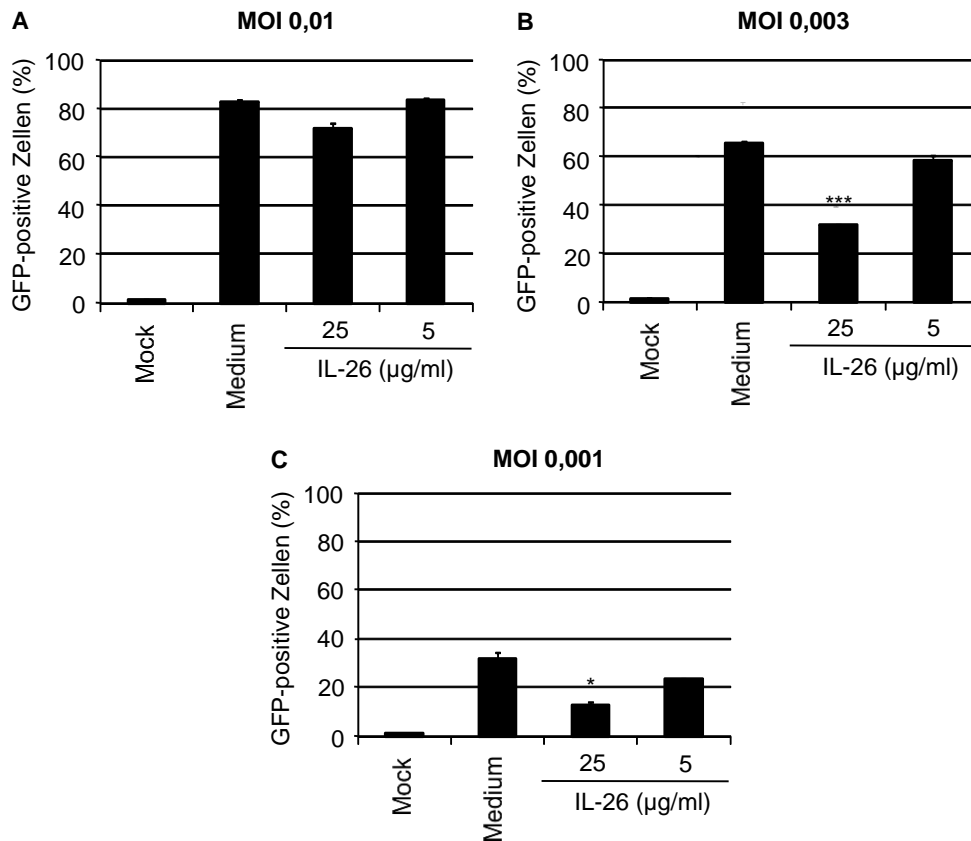


Abb. 6: Abhängigkeit des IL-26-Effektes von der verwendeten MOI (0,01-0,001). Die Zellen wurden mit IL-26 über 5 min vorbehandelt und anschließend mit hCMV in verschiedenen MOIs infiziert. An d 5 p.i. wurden die Zellen in 2% PFA fixiert und die Anzahl der GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. A) MOI = 0,01, B) MOI = 0,003, C) MOI = 0,001.

Außerdem wurde die Genexpression von IFN- β 1 in Abhängigkeit von der verwendeten MOI untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA nach 6 h p.i. isoliert und die IFN- β 1-Expression wurde über eine RT-PCR bestimmt. Zur Infektion der primären Fibroblasten wurde hCMV in MOIs zwischen 0,3 und 0,0003 verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend im Agarosegel aufgetrennt und die IFN- β 1-Produkte vergleichend zu denjenigen für das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aufgetragen. Für GAPDH zeigte sich eine homogene Verteilung der Intensitäten der erhaltenen Banden und somit eine vergleichbare Gesamtmenge an cDNA. Bei einer verwendeten MOI = 0,3 konnte ein Unterschied in der IFN- β 1-Expression zwischen Medium und IL-26 in einer Konzentration von 25 µg/ml nicht festgestellt werden. Mit abnehmender MOI zeigte sich jedoch, dass die IFN- β 1-Signalstärke nach Vorbehandlung mit IL-26 im Vergleich zur Medium-Kontrolle zunahm. Bei MOIs < 0,003 waren in der Mediumkontrolle kaum noch Banden zu erkennen, während bei IL-26 noch ein deutliches Signal sichtbar war (Abb. 7).

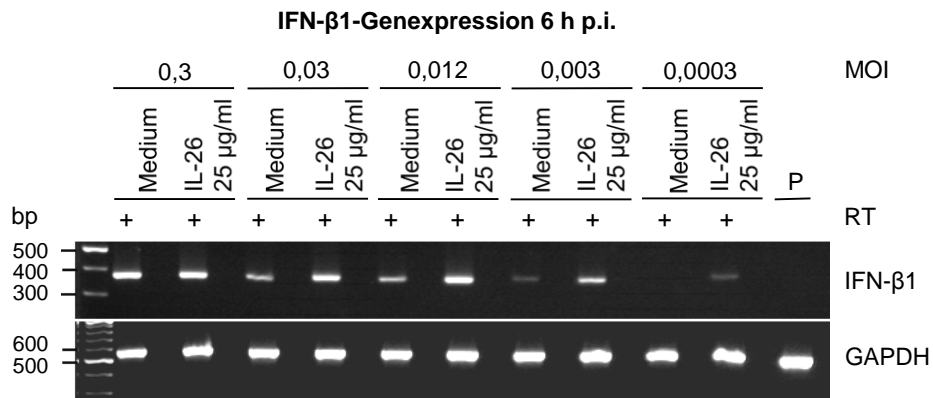


Abb. 7: IFN-β1-Expression in Abhängigkeit von der verwendeten MOI. Nach Vorbehandlung der Zellen mit IL-26 oder Medium erfolgte die Infektion mit hCMV in verschiedenen MOIs. Nach 6 h p.i. wurde die Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Die IFN-β1-cDNA wurde in einer PCR über 31 Zyklen (Primer 2312/ 2313, 376 bp) amplifiziert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Zum Ausschluss einer Verunreinigung mit zellulärer DNA erfolgte je ein Ansatz mit oder ohne Reverse Transkriptase. Die IFN-β1-Expression wurde mit derjenigen des Haushaltgens GAPDH verglichen (2371/2372, 566 bp, 24 Zyklen).

Zur Quantifizierung des Effektes erfolgte die Bestimmung der Menge an IFN-β1-Transkripten aus den gewonnenen cDNA-Proben in einer quantitativen-PCR. Die Ergebnisse wurden dabei anhand der bestimmten GAPDH-Transkript-Konzentration normalisiert. In der Untersuchung zeigte sich, dass die IFN-β1-Expression nach IL-26-Behandlung bei allen verwendeten MOIs höher ausfiel als in der Mediumkontrolle. Die Effektstärke nahm jedoch mit sinkender MOI zu. So war die relative IFN-β1-Expression in Bezug zu Medium bei MOI = 0,3 nur gering gesteigert. Dagegen war die relative Expression mit einer MOI zwischen 0,03 bis 0,003 4-6x erhöht. Der größte Unterschied ließ sich bei einer MOI = 0,0003 ausmachen, bei der die IFN-β1-Expression 16x erhöht war (Abb. 8).

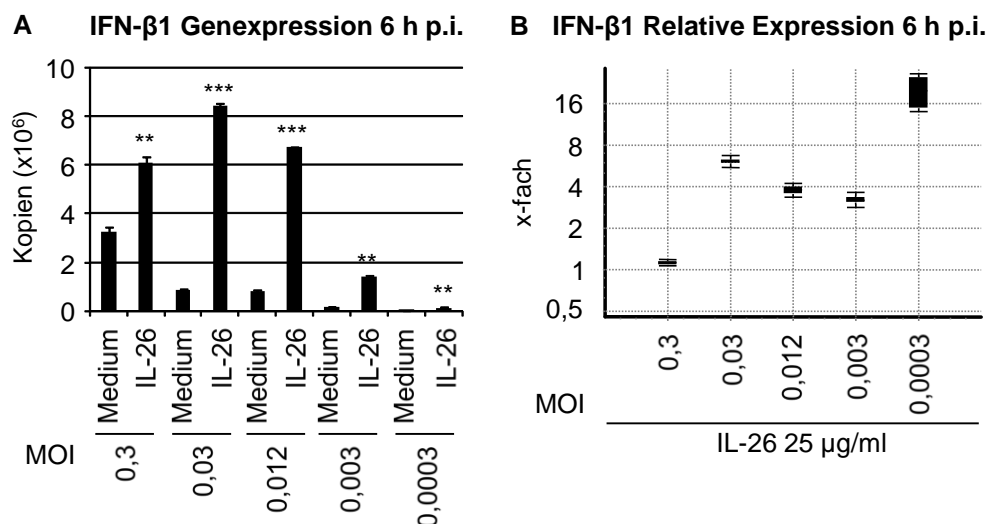


Abb. 8: Quantitative-PCR der IFN-β1-Expression in Abhängigkeit von der verwendeten MOI. Die Menge an Transkripten für IFN-β1 und GAPDH aus den in Abb. 7 gezeigten cDNA-Proben nach 6 h p.i. wurde mittels quantitativer-PCR bestimmt. A) Absolute IFN-β1-Expression nach Behandlung mit IL-26 in einer Konzentration von 25 µg/ml und Normalisierung auf das Haushaltgen GAPDH, B) Relative IFN-β1-Expression im Vergleich zu Medium.

Die antiviralen Eigenschaften von IL-26 werden von der verwendeten MOI und somit von der Anzahl infektiöser Viruspartikel beeinflusst. In den Untersuchungen wurde gezeigt, dass bei niedrigen MOIs nach IL-26-Vorbehandlung in Relation zu Medium weniger Zellen mit dem Virus infiziert waren. In Korrelation hierzu nimmt die relative IFN- β 1-Expression bei niedriger MOI zu.

5.3 Vorinkubation mit IL-26

In den anschließenden Infektionsexperimenten wurde untersucht, ob die Vorinkubation der primären Fibroblasten oder von hCMV mit IL-26 einen Einfluss auf die Virusinfektion ausübt. Dazu wurden zwei Gruppen gebildet (Vorinkubation des hCMV versus Vorinkubation der Zellen) und die Zellen oder hCMV für jeweils 30 min mit IL-26 oder dem synthetischen kationischen Polymer Polybren als Vergleichssubstanz bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit hCMV mit einer MOI = 0,003. An d 6 p.i. wurden die Zellen fixiert und die Anzahl GFP-positiver, virusinfizierter Zellen in der Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 9). Dabei zeigte sich, dass es in Übereinstimmung zu den Voruntersuchungen durch IL-26 zu einer Konzentrations-abhängigen Reduktion der Anzahl virusinfizierter Zellen kam. Im Vergleich zwischen einer Vorinkubation der Zellen oder des Virus waren allerdings keine Unterschiede auszumachen. Lediglich bei einer verwendeten IL-26-Konzentration von 1 μ g/ml war ein signifikanter Unterschied der relativen Anzahl GFP-positiver Zellen in Bezug auf Medium detektierbar. In höheren IL-26-Konzentrationen war hingegen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Polybren führte in einer Konzentration von 2,5 μ g/ml zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl GFP-positiver Zellen. Niedrigere Konzentrationen wiesen keinen Effekt auf.

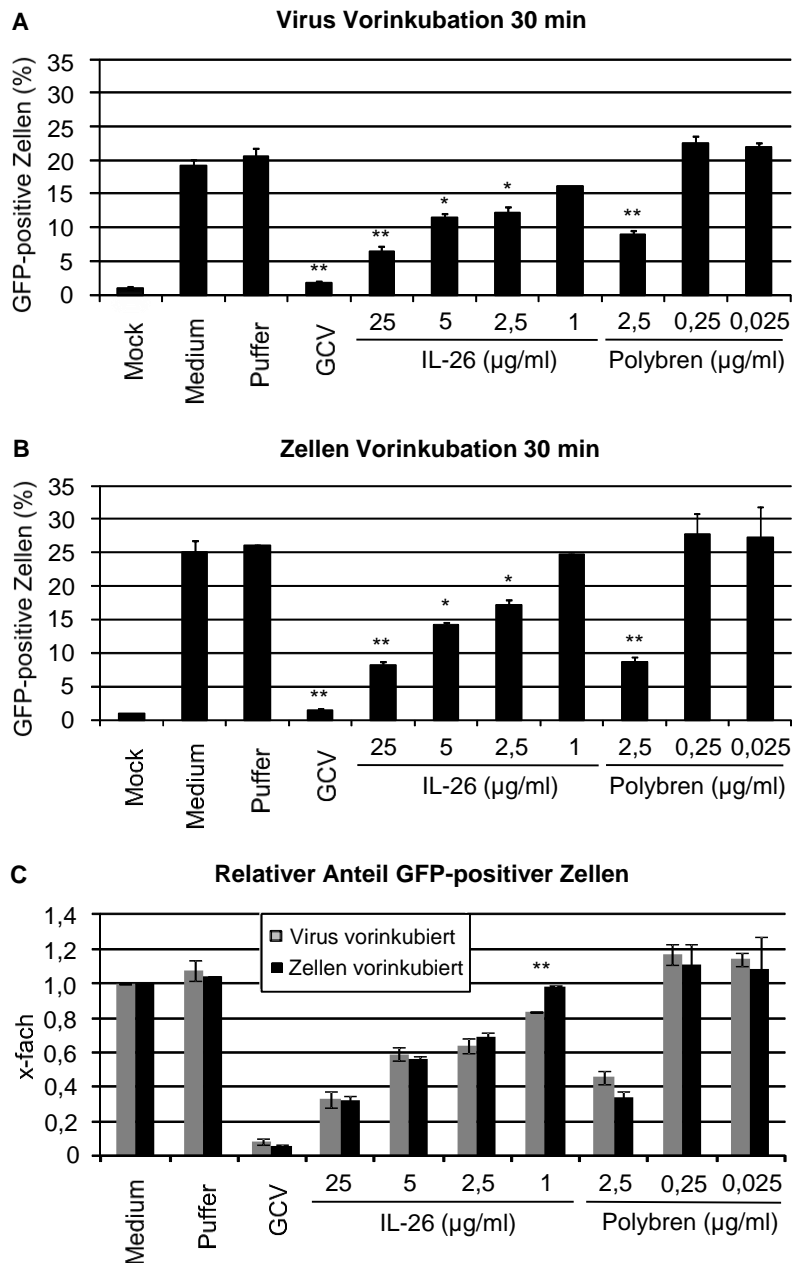


Abb. 9: Vorinkubation von primären Fibroblasten oder hCMV mit IL-26 über 30 min. Die Vorinkubation von Zellen oder hCMV erfolgte für 30 min bei 37°C mit IL-26 und Polybren. Anschließend wurden die Zellen mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert. Der Anteil GFP-positiver Zellen wurde nach Fixierung in 2% PFA an d 6 p.i. in der Durchflusszytometrie bestimmt. A) Vorinkubation von hCMV mit IL-26, B) Vorinkubation von Fibroblasten mit IL-26, C) Relativer Anteil GFP-positiver Zellen in Relation zu Medium.

Eine Vorinkubation der Zellen oder des Virus hat somit keinen Einfluss auf den Effekt von IL-26 auf die hCMV-Infektion. Polybren übt also ähnlich wie IL-26 einen Konzentrations-abhängigen antiviralen Effekt auf die hCMV-Infektion aus.

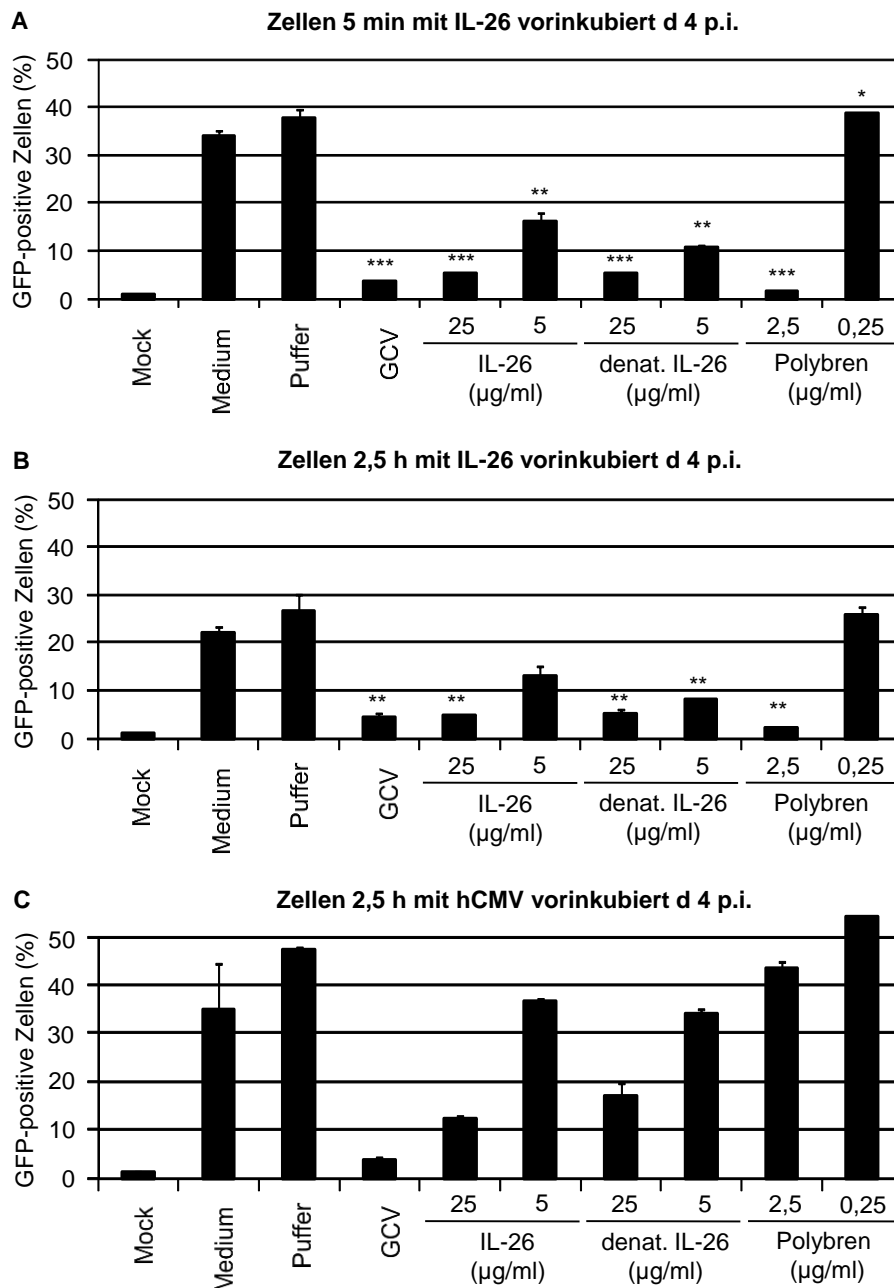


Abb. 10: Vorinkubation von primären Fibroblasten oder hCMV mit IL-26 für 2,5 h. Die Zellen wurden über 5 min oder 2,5 h mit IL-26 vorinkubiert und anschließend mit hCMV infiziert (MOI = 0,003) oder die Infektion erfolgte zunächst mit gleicher MOI und die anschließende Zytokingabe nach 2,5 h. Als Vergleichssubstanzen wurden über 10 min bei 95°C hitzedenaturiertes IL-26 und Polybren verwendet. A) Vorinkubation mit IL-26 über 5 min, B) Vorinkubation mit IL-26 über 2,5 h und C) Nach primärer Infektion mit hCMV erfolgte die Behandlung mit IL-26 2,5 h p.i.

Sodann wurde der zeitliche Einfluss der IL-26-Behandlung auf die Stärke des antiviralen Effektes untersucht. Hierzu wurden drei Gruppen gebildet. In der ersten Gruppe erfolgte die hCMV-Infektion nach kurzer Vorbehandlung über 5 min in Übereinstimmung zu den oben beschriebenen Experimenten. Verwendung fanden IL-26, über 10 min bei 95°C hitzedenaturiertes IL-26 und Polybren in verschiedenen Konzentrationen. In der zweiten Gruppe wurden die Zellen über 2,5 h vorinkubiert. In der dritten Gruppe erfolgte zunächst die Infektion der Zellen mit hCMV und eine anschließende Behandlung mit IL-26 nach 2,5 h p.i. (Abb. 10).

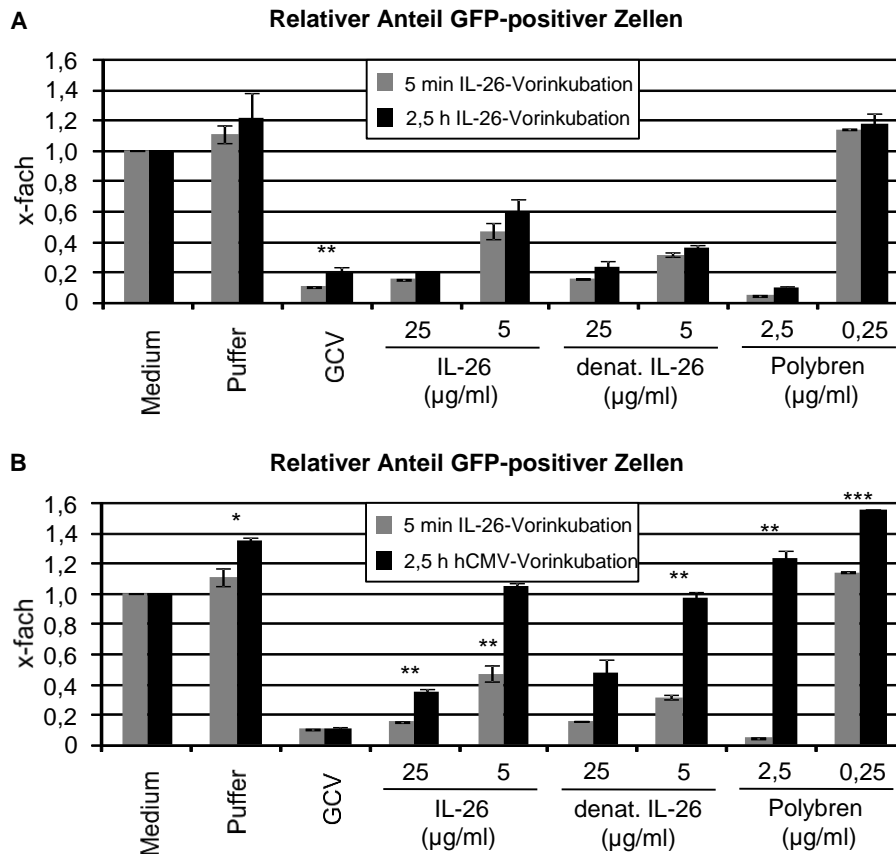


Abb. 11: Relativer Anteil virusinfizierter Zellen nach Vorinkubation mit IL-26 oder hCMV. Der Anteil virusinfizierter Zellen ist in Relation zu Medium dargestellt. Der Wert für Medium wurde dabei auf 1 adjustiert. A) Vergleich zwischen einer Vorinkubation mit IL-26 über 5 min und einer Vorinkubation über 2,5 h, B) Vergleich zwischen Vorinkubation mit IL-26 über 5 min und primärer hCMV-Infektion mit IL-26-Behandlung nach 2,5 h p.i.

Die Ergebnisse der ersten und zweiten Gruppe waren vergleichbar und zeigten wie in den Voruntersuchungen eine signifikante Reduktion der Anzahl GFP-positiver, virusinfizierter Zellen nach IL-26-Behandlung. Auch das hitzedenaturierte IL-26 führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl GFP-positiver Zellen. Die Effektstärke war dabei vergleichbar mit der des nativen IL-26. In hoher Konzentration hatte auch Polybren einen signifikanten antiviralen Effekt. Der IL-26-Dialysepuffer hatte aber keine Auswirkung auf die Virusinfektion.

In der dritten Gruppe mit einer primären Infektion der Zellen und anschließender Zugabe von IL-26 zeigte sich im Vergleich zu den anderen Messwerten eine deutlich größere Anzahl GFP-positiver Zellen. Der relative Anteil GFP-positiver Zellen war dabei bei IL-26-Konzentrationen von 5 und 25 µg/ml, dem hitzedenaturierten IL-26 in einer Konzentration von 5 µg/ml und Polybren in allen verwendeten Konzentrationen signifikant gegenüber einer Vorinkubation und anschließender Infektion mit hCMV erhöht. Auch der IL-26-Dialysepuffer bewirkte mit einem p-Wert <0,05 eine signifikante Zunahme des relativen Anteils virusinfizierter Zellen.

Durch Gegenüberstellung des relativen Anteiles GFP-positiver Zellen konnte diese Beobachtung bestätigt werden. So waren im Vergleich zwischen der primären Infektion und der anschließenden Zytokingabe mehr Zellen infiziert als nach einer kurzen Vorinkubation (5 min) mit dem Zytokin und anschließender Infektion. Dabei war der Unterschied für IL-26, dem hitzedenaturiertem IL-26 und Polybren jeweils signifikant. Die Ergebnisse zwischen einer kurzen Vorinkubation der Zellen und einer Inkubation über 2,5 h unterschieden sich dabei nicht, mit Ausnahme einer signifikanten Erhöhung des relativen Anteils GFP-positiver Zellen nach Inkubation mit GCV über 2,5 h (Abb. 11).

Der Zeitpunkt der Zugabe von IL-26 beeinflusst also die Anzahl virusinfizierter Zellen. Erfolgte die IL-26-Behandlung vor der Virusinfektion, waren signifikant weniger Zellen infiziert, was auf eine Bedeutung von IL-26 in der Frühphase der Virusinfektion hindeutet. Die Effektstärke des hitzedenaturierten IL-26 ist vergleichbar mit der des nativen Zytokins.

5.4 Vorinkubation mit Anti-IL-26-Serum

Unter Verwendung eines IL-26-spezifischen Serums wurde versucht, den antiviralen Effekt von IL-26 auf die hCMV-Infektion primärer Fibroblasten aufzuheben. Ein polyklonales Kaninchen-Serum wurde verwendet. Das verwendete Serum führte in Voruntersuchungen zu einer effektiven Inhibition der IL-26-bedingten STAT-Phosphorylierung (Knappe et al., 2000; Hör et al., 2004; Braum, 2013). IL-26 wurde für 15 min mit dem Serum in einer Verdünnung von 1:100 oder PBS als Kontrolle vorinkubiert und die Zellen wurden anschließend nach Vorbehandlung mit dem IL-26-Serumansatz mit hCMV mit einer MOI = 0,003 infiziert. An d 6 p.i. erfolgte die Auswertung der GFP-positiven Zellen in der Durchflusszytometrie (Abb. 12). Nach Vorinkubation von IL-26 mit dem Serum war die Anzahl GFP-positiver, virusinfizierter Zellen gegenüber der Kontrollgruppe sogar leicht erhöht. Der in Voruntersuchungen beobachtete antivirale Effekt fiel vergleichsweise schwächer aus und erreichte keine statistische Signifikanz. Jedoch ergab sich in der Kontrollgruppe mit einer Vorinkubation zusammen mit PBS ebenfalls kein signifikanter Effekt von IL-26. Im Vergleich des relativen Anteiles GFP-positiver Zellen bezogen auf Medium war die Anzahl virusinfizierter Zellen leicht vermindert. Allerdings ergab sich nur bei einer verwendeten IL-26-Konzentration von 1 µg/ml ein signifikant erhöhter relativer Anteil virusinfizierter Zellen nach Vorinkubation von IL-26 zusammen mit dem Serum. In der Untersuchung konnte also gezeigt werden, dass das verwendete Anti-IL-26-Serum keinen signifikanten Einfluss auf die Virusinfektion ausübte.

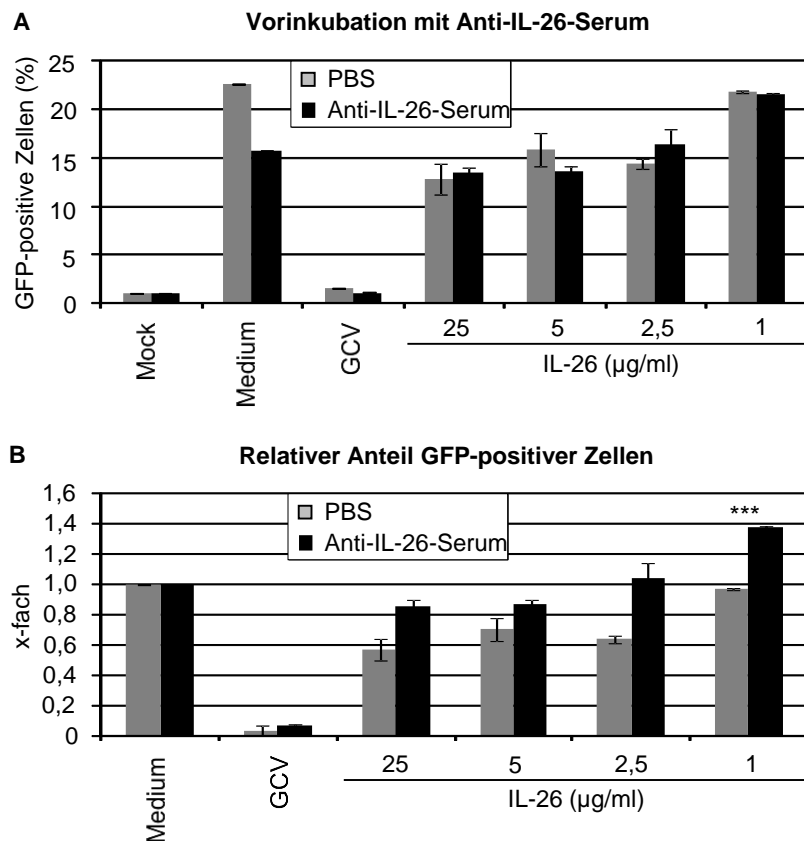


Abb. 12: Vorinkubation mit einem polyklonalen Anti-IL-26-Serum. IL-26 wurde zunächst über 15 min mit dem Serum in einer Verdünnung von 1:100 oder mit PBS vorinkubiert. Anschließend erfolgte nach Vorbehandlung der Zellen die Infektion mit hCMV (MOI = 0,003). An d 6 p.i. wurden die Zellen in 2% PFA fixiert und der Anteil GFP-positiver Zellen in der Durchflusszytometrie bestimmt. A) Absoluter Anteil GFP-positiver Zellen, B) Relativer Anteil GFP-positiver Zellen bezogen auf Medium.

5.5 Einfluss von IL-26 auf die Infektion mit dem Herpes-simplex-Virus Typ 1

HSV-1 gehört zusammen mit hCMV zu den humanen Herpesviren. Da in den Infektionsexperimenten ein antiviraler Effekt von IL-26 auf hCMV nachgewiesen wurde, sollte untersucht werden, ob es sich hierbei um eine hCMV-spezifische Eigenschaft von IL-26 handelt. Dazu wurden primäre Fibroblasten, wie in den vorhergehenden Infektionsexperimenten beschrieben, für 5 min mit dem Zytokin vorbehandelt und anschließend mit HSV-1 mit der MOI = 0,003 in Übereinstimmung zu den Versuchen mit hCMV infiziert. Die Auswertung der Experimente erfolgte zum einen im Mikrotiterplatten-Fluorimeter und zum anderen in der Durchflusszytometrie. Als Vergleichssubstanzen wurden Polybren und als Positivkontrolle für einen möglichen antiviralen Effekt das Nukleosidanalogen Aciclovir (ACV) verwendet.

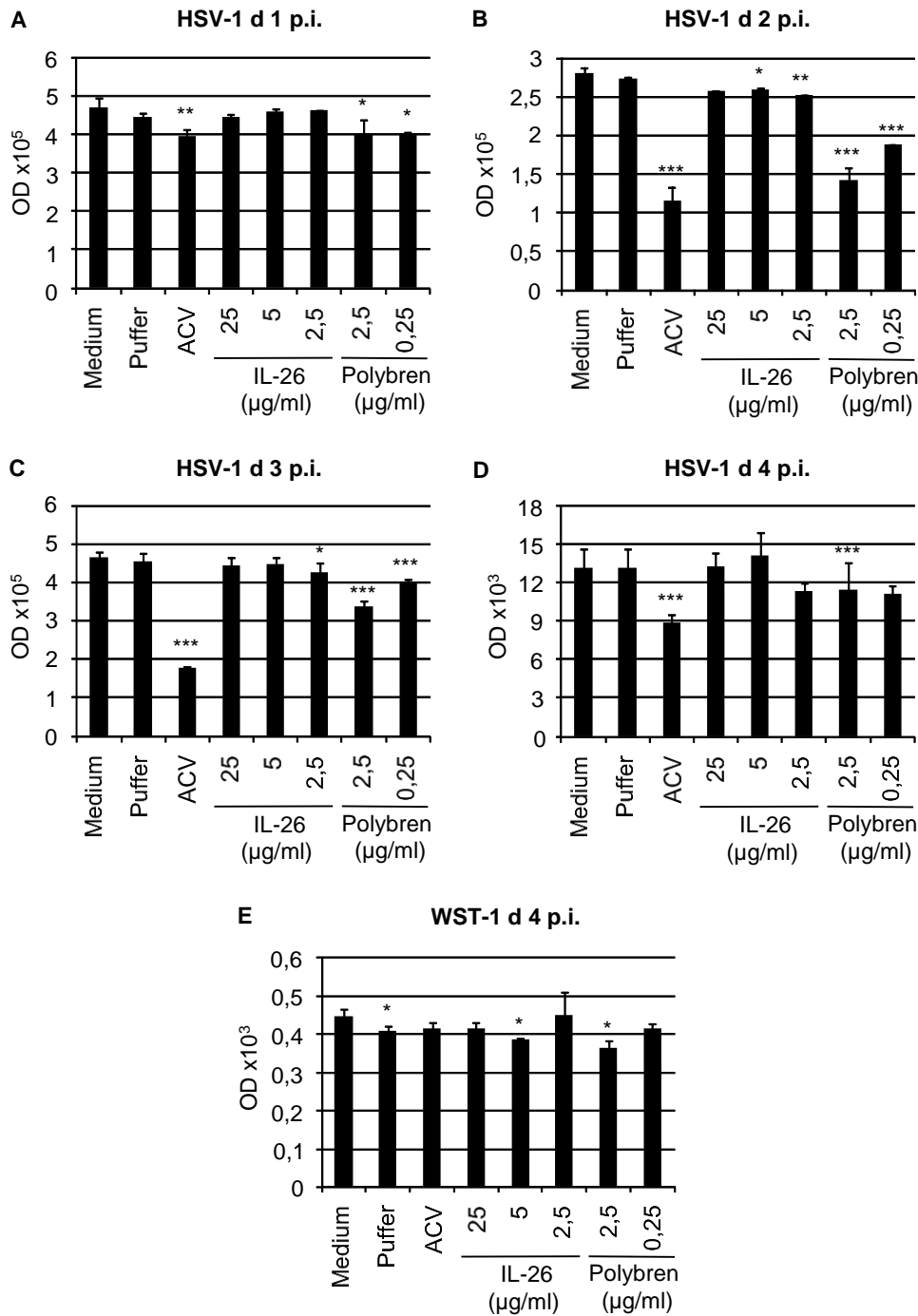


Abb. 13: Der Effekt von IL-26 auf die HSV-1-Infektion in der Mikrotiterplatten-Fluorimetrie. Primäre Fibroblasten wurden jeweils mit IL-26 und Polybren in verschiedenen Konzentrationen vorbehandelt. Als Kontrollen wurden Medium, IL-26-Dialysepuffer und ACV (0,01 mM) verwendet. Die Zellen wurden anschließend mit HSV-1 (MOI = 0,003) infiziert. An definierten Zeitpunkten erfolgte die Messung der GFP-abhängigen Fluoreszenz (Angabe als „optische Dichte“, OD) im Mikrotiterplatten-Fluorimeter. A) d 1 p.i., B) d 2 p.i., C) d 3 p.i., D) d 4 p.i., E) d 4 p.i. WST-1-Messung zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität und damit indirekt der vitalen Zellen.

Die Messungen am Mikrotiterplatten-Fluorimeter erfolgten zwischen d 1 bis 4 p.i. An d 4 p.i. wurde zudem eine Bestimmung der mitochondrialen Aktivität und damit indirekt der vitalen Zellen eine Messung mit WST-1 durchgeführt (Abb. 13). Hierbei zeigte sich im Wesentlichen eine homogene Verteilung der Messwerte. Nach Vorbehandlung mit dem IL-26-Dialysepuffer, IL-26 in einer Konzentration von 5 µg/ml und Polybren 2,5 µg/ml war die GFP-

fluoreszenzabhängige optische Dichte mit einem p-Wert <0,05 vermindert. ACV führte erwartungsgemäß zu einer Reduktion der GFP-bedingten Fluoreszenz und damit der Anzahl virusinfizierter Zellen. Obwohl in einzelnen Messungen eine signifikante Reduktion der GFP-bedingten Fluoreszenz nach IL-26-Behandlung detektiert wurde, ließ sich kein belegbarer Effekt auf die HSV-1-Infektion erkennen. Bei diesen Messwerten war weder eine Konstanz über die Zeitdauer der Untersuchung noch eine Abhängigkeit von der verwendeten Zytokin-konzentration zu erkennen. Dahingegen konnte Polybren die GFP-bedingten Fluoreszenz Konzentrations-abhängig signifikant reduzieren.

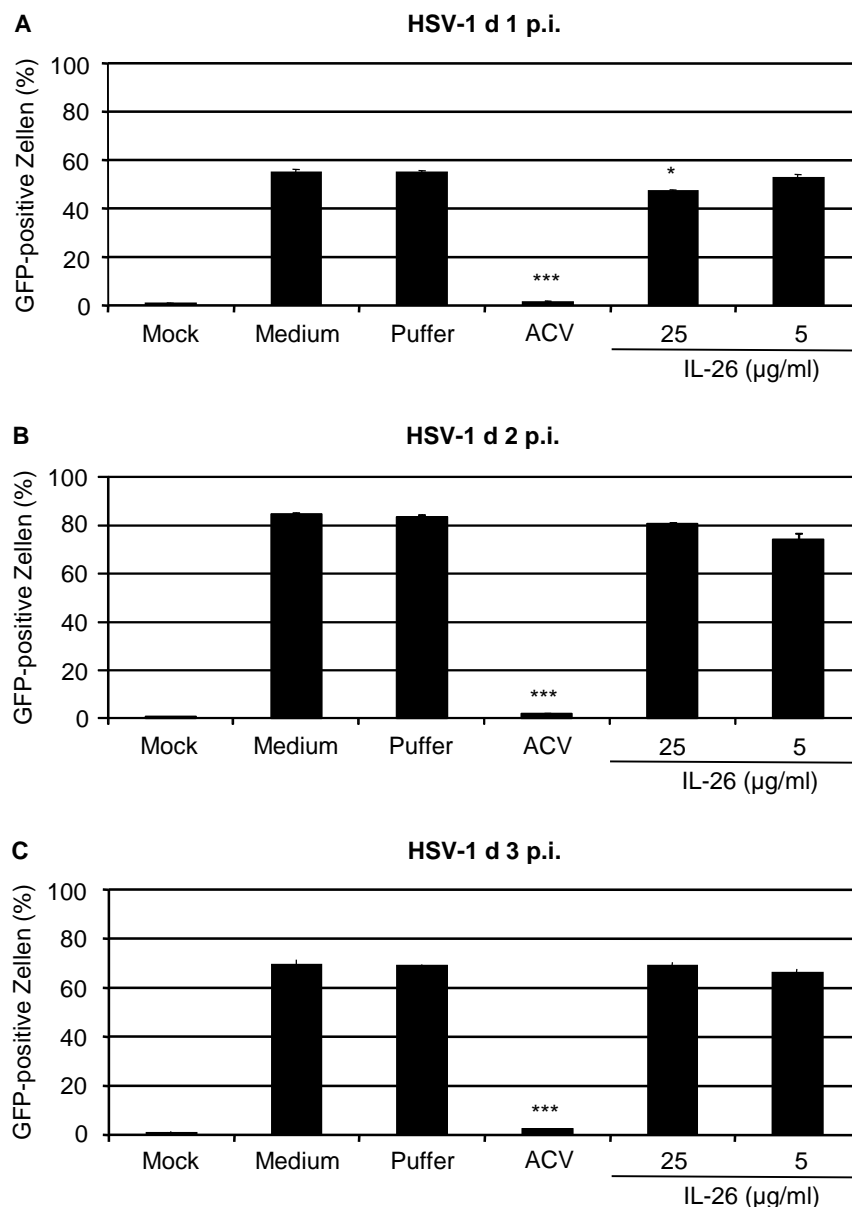


Abb. 14: Der Effekt von IL-26 auf die HSV-1-Infektion in der Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden jeweils für 5 min mit IL-26 vorbehandelt und mit HSV-1 (MOI = 0,003) infiziert. An d 1 bis 3 p.i. wurden die Zellen in 2% PFA fixiert und die Anzahl der GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. A) d 1 p.i., B) d 2 p.i. und C) d 3 p.i.

Zur Bestätigung der Vorergebnisse und zu deren genauerer Quantifizierung wurde die Anzahl GFP-positiver, virusinfizierter Zellen in der Durchflusszytometrie bestimmt. Dazu wurden die mit IL-26 vorbehandelten und anschließend mit HSV-1 infizierten Zellen an d 1 bis 3 p.i. in 2 % PFA fixiert und die GFP-Fluoreszenz wurde ausgewertet (Abb. 14). ACV führte über den gesamten Untersuchungszeitraum zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl virusinfizierter Zellen. Die Messwerte von Medium, dem IL-26-Dialysepuffer und IL-26 unterschieden sich mit einer Ausnahme bei IL-26 an d 1 p.i. in einer Konzentration von 25 µg/ml nicht signifikant. Zusammenfassend konnte also kein Einfluss von IL-26 auf die Infektion mit humanem HSV-1 nachgewiesen werden. Allerdings konnte durch Vorbehandlung der Zellen mit Polybren die Anzahl der virusinfizierten Zellen reduziert werden.

5.6 Expression des IL-26-Rezeptors in primären Fibroblasten

Der IL-26R wird aus der langen Liganden-bindenden Rezeptorkette IL-20R1 und der kurzen akzessorischen Rezeptorkette IL-10R2 gebildet. Die Signaltransduktion erfolgt über die Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Faktoren. Durch Bindung von IL-26 kommt es dabei hauptsächlich zur Phosphorylierung von STAT-3 und, zu einem geringeren Teil, auch STAT-1 (Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004). Im Weiteren sollte bestimmt werden, ob der beschriebene Effekt von IL-26 über den IL-26R vermittelt wird. Dazu wurde untersucht, ob die primären Fibroblasten einen funktionellen IL-26R exprimieren. Dazu wurde sowohl die RNA-Expression der Rezeptorketten als auch die IL-26-abhängige Phosphorylierung der STAT-Faktoren untersucht.

Zunächst wurde aus Gesamt-RNA-Proben primärer Fibroblasten die Expression von IL-20R1 und IL-10R2 in der RT-PCR detektiert. Zur Analyse wurden jeweils cDNA-Proben Mock-infizierter oder mit IL-26 behandelter und hCMV-infizierter Zellen verwendet. Eine Expression von IL-20R1 konnte erst nach 36 Replikationszyklen festgestellt werden (Abb. 15). Während sich mit dem Primerpaar 2339/2340 schwache Banden an erwarteter Stelle im Agarosegel zeigten, konnte eine Expression mit dem Primerpaar 2331/2332 nicht nachgewiesen werden. Die akzessorische Rezeptorkette IL-10R2 kam hingegen mit deutlich sichtbaren Banden wesentlich stärker zur Darstellung. Als Positivkontrolle wurden cDNA-Proben der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Colo-205 verwendet. In dieser Zelllinie wurde die Expression eines funktionellen IL-26R bestätigt (Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004).

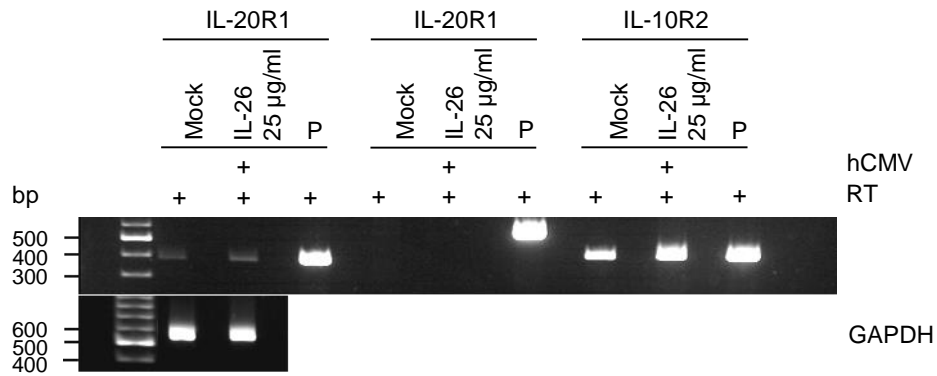


Abb. 15: Genexpression des IL-26R in primären Fibroblasten. Gesamt-RNA-Proben Mock-infizierter und hCMV-infizierter Fibroblasten wurden nach Vorbehandlung mit IL-26 nach 24 h p.i. gewonnen. Die hCMV-Infektion erfolgte mit einer MOI = 0,003. Die Proben wurden in einer RT-PCR über 36 Zyklen amplifiziert. Die IL-20R1-Expression wurde mit den Primerpaaren 2339/2340 (360 bp, links) und 2331/2332 (553 bp, Mitte) untersucht. Die IL-10R2-Expression wurde mit den Primern 2337/2338 (411 bp, rechts) nachgewiesen. P=Positivkontrolle. Zum Ausschluss einer Verunreinigung mit zellulärer DNA wurde jeweils eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

Die vorliegenden Daten zeigen also, dass RNA der Liganden-bindenden Rezeptorkette IL-20R1 von primären Fibroblasten allenfalls in sehr geringem Ausmaß exprimiert wird.

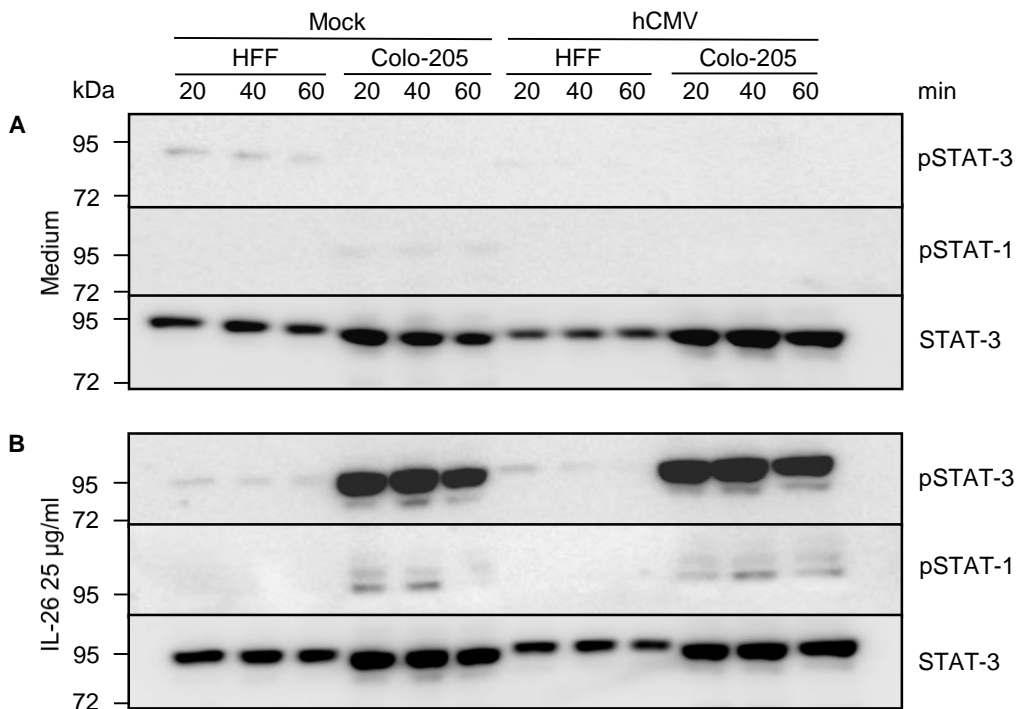


Abb. 16: IL-26-bedingte Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-3. Zelllysate primärer Fibroblasten (HFF) und von Colo-205-Zellen wurden 20, 40 und 60 min nach Behandlung mit dem Zytokin oder Medium gewonnen und die Proteine pSTAT-1 und pSTAT-3 mit spezifischen Antikörpern im Immunblot nachgewiesen. Als Kontrollprotein ist das Gesamt-STAT-3 dargestellt. Ein Teil der Zellen wurde Mock-infiziert und der andere Teil mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert. A) HFF und Colo-205 nach Behandlung mit Medium, B) HFF und Colo-205 nach Behandlung mit IL-26 in einer Konzentration von 25 µg/ml.

Da in primären Fibroblasten allenfalls eine sehr schwache RNA-Expression der Liganden-bindenden Rezeptorkette IL-20R1 detektiert wurde, sollte im nächsten Schritt untersucht

werden, ob es nach IL-26-Gabe zu einer Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-3 kommt. Hierzu wurden die Fibroblasten mit Medium oder IL-26 behandelt und die phosphorylierten STAT-Faktoren pSTAT-1 und pSTAT-3 mit spezifischen Antikörpern im Vergleich zu STAT-3 im Immunblot nachgewiesen. Zum Vergleich wurde die IL-26-responsive Zelllinie Colo-205 verwendet. Sowohl Proben nach Mock-Infektion als auch nach hCMV-Infektion wurden untersucht. Hierzu wurden die Zellysate nach 20, 40 und 60 min p.i. asserviert und im SDS-PAGE für den Immunblot aufgetragen (Abb. 16). In der Mediumkontrolle konnte unabhängig von einer hCMV-Infektion bei primären Fibroblasten eine sehr schwache und bei Colo-205-Zellen keine STAT-Phosphorylierung gezeigt werden. Während sich jedoch nach Gabe von IL-26 bei den Colo-205-Zellen pSTAT-3 und, zu einem geringeren Teil, auch pSTAT-1 detektieren ließ, waren an gleicher Stelle bei den primären Fibroblasten nur sehr schwache Banden auszumachen, die sich an identischer Stelle jedoch auch nach Behandlung mit Medium gezeigt hatten. pSTAT-1 konnte in primären Fibroblasten nicht nachgewiesen werden.

Obwohl primäre Fibroblasten eine sehr schwache RNA-Expression des IL-26R aufweisen, findet über den IL-26R keine Signaltransduktion statt. Eine Aktivierung der STAT-Faktoren STAT-1 und STAT-3, die in der IL-26R-Signaltransduktion phosphoryliert werden, war nicht nachweisbar. Primäre Fibroblasten verfügen somit nicht über einen funktionellen IL-26R.

5.7 Expression antiviraler Gene in Abhängigkeit von IL-26

Zur Abwehr viraler Infektionen verfügen Eukaryonten über verschiedene Mechanismen, die einer Infektion entgegenwirken. Eine besondere Bedeutung hierbei haben die IFNe. Die Subgruppe der β -IFNe wird von nicht-Immunzellen infolge einer viralen Infektion gebildet. Die in den Infektionsexperimenten verwendeten primären Fibroblasten sind in der Lage, β -IFN zu exprimieren. Durch IFN kommt es zu einer Induktion der Expression antiviral wirksamer Gene und anderer IFN-regulierter Gene. Zu den Genprodukten zählen das *Myxovirus-resistance Protein A* (MxA), die 2'5'-Oligoadenylat-Synthetase (2'5'-OAS), die Proteinkinase R (PKR), das *IFN-stimulated gene 15* (ISG15) und der *IFN-regulatory factor 1* (IRF-1).

Die Genexpression hCMV-infizierter primärer Fibroblasten wurde nach 5 min Vorbehandlung mit Medium, IL-26 oder Polybren untersucht. Als Positivkontrolle für die Induktion IFN-responsiver Gene wurde IFN- α in einer Konzentration von 1000 U/ml verwendet. Nach 6 und 24 h p.i. wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Genexpression in der RT-PCR bestimmt. Zum Ausschluss einer Verunreinigung durch zelluläre DNA erfolgte jeweils eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase. Außerdem erfolgte der Vergleich zwischen einer Mock-Infektion und der hCMV-Infektion (Abb. 17).

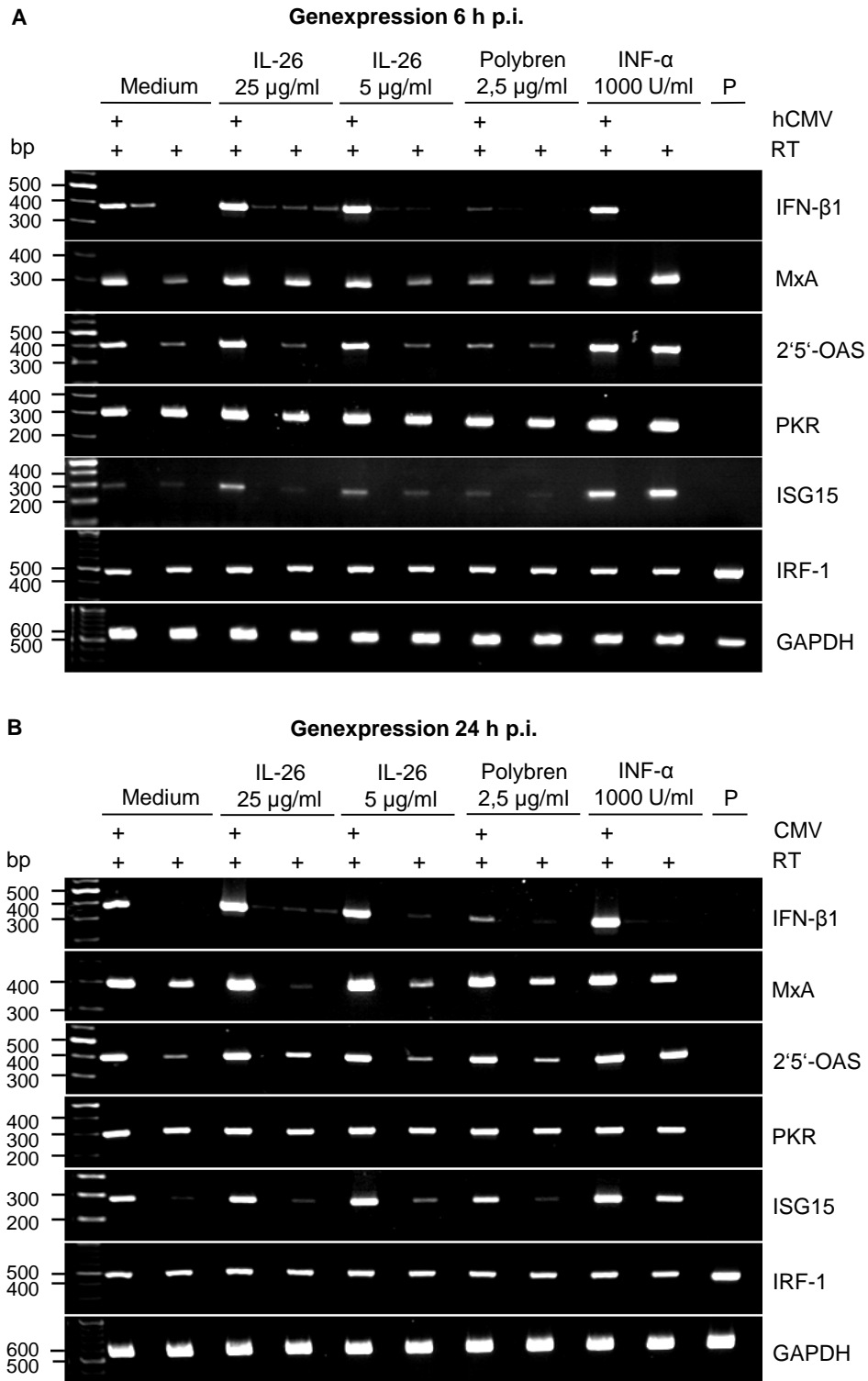


Abb. 17: Genexpression von IFN-β1, MxA, 2'5'-OAS, PKR, ISG15 und IRF-1. Primäre Fibroblasten wurden mit IL-26, Polybren und INF-α vorbehandelt und anschließend mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert. Nach 6 und 24 h p.i. wurde Gesamt-RNA gewonnen und die Expression der Gene in einer RT-PCR bestimmt. Die cDNA wurde mit spezifischen Primern amplifiziert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Primer kamen zur Anwendung: IFN-β1 (2312/2313, 376 bp, 30 Zyklen), MxA (2083/2084, 289 bp, 27 Zyklen), 2'5'-OAS (2085/2086, 400 bp, 28 Zyklen), PKR (2087/2088, 301 bp, 25 Zyklen), ISG15 (2089/2090, 278 bp, 25 Zyklen), IRF-1 (2201/2194, 483 bp, 29 Zyklen). Das Haushaltsgen GAPDH (2371/2372, 566 bp, 23 Zyklen) wurde zur Kontrolle verwendet. P=Positivkontrolle. Außerdem erfolgte jeweils eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase zum Ausschluss einer Verunreinigung mit genomischer DNA. A) Genexpression 6 h p.i., B) Genexpression 24 h p.i.

Nach 6 h p.i. ließen sich in der RT-PCR für IFN- β 1 nach IL-26-Behandlung gegenüber Medium deutlich stärkere Banden im Agarosegel detektieren. Die Signalintensität zwischen den eingesetzten IL-26-Konzentrationen unterschied sich aber nicht. Polybren führte gegenüber Medium zu einer schwächeren IFN- β 1-Expression, wohingegen diese bei Einsatz von IFN- α annähernd gleich ausfiel. Mit Ausnahme von IL-26 in einer Konzentration von 25 μ g/ml zeigte sich nach Mock-Infektion keine IFN- β 1-Expression. Diese war jedoch nur schwach ausgeprägt und entsprach in etwa der Kontrolle ohne reverse Transkription, welche sowohl bei Medium als auch IL-26 schwach positiv ausfiel. Dies deutet auf eine Verunreinigung mit zellulärer DNA hin. Nach 24 h p.i. zeigte sich eine vergleichbare Verteilung. IL-26 und IFN- α verstärkten die Expression von IFN- β 1. Bei IL-26, Polybren und IFN- α wurde nach Mock-Infektion eine leicht erhöhte Expression detektiert, allerdings waren auch hier einige RT-Kontrollen schwach positiv.

Mit der gesteigerten IFN- β 1-Expression korrelierte die gesteigerte Expression der Gene MxA, 2'5'-OAS und ISG15. Dieser Effekt war sowohl nach 6 h als auch nach 24 h p.i. nachweisbar. IL-26 führte hier zu einer deutlichen Konzentrations-abhängigen Verstärkung der Genexpression. Eine höhere IL-26-Konzentration führte zu einer verstärkten Expression. Polybren führte hingegen zu einer verminderten Genexpression. In der Positivkontrolle mit IFN- α zeigten sich sowohl bei Mock-Infektion als auch einer Infektion mit hCMV stark ausgeprägte Banden. Auf die Expression von IRF-1 und PKR konnten im gesamten Untersuchungszeitraum keine Auswirkungen gezeigt werden. Das Haushaltsgen GAPDH wies eine gleichmäßige Verteilung der Signalintensitäten zwischen den einzelnen Proben auf.

Die Expression der antiviral wirksamen Gene IFN- β 1, MxA, 2'5'-OAS und ISG15 in primären Fibroblasten wird somit durch IL-26 nach einer Infektion mit hCMV gesteigert. IL-26 alleine beeinflusst dabei ohne das Vorliegen der Virusinfektion die Genexpression nicht.

SOCS-3 konnte als ein durch IL-26-induzierbares Gen identifiziert werden (Braun, 2013). Deshalb wurde der Einfluss von IL-26 auf die Expression von SOCS-3 untersucht. Dazu wurden, analog zu den oben beschriebenen Experimenten, Gesamt RNA-Proben nach hCMV-Infektion 1 h p.i. gewonnen und die SOCS-3-Expression in einer RT-PCR bestimmt (Abb. 18). Nach 1 h p.i. war der Gehalt an SOCS-3 im Vergleich zwischen IL-26 in einer Konzentration von 25 μ g/ml und Medium nach hCMV-Infektion ungefähr gleich. Allerdings war die SOCS-3-Expression bei einer IL-26-Konzentration von 5 μ g/ml gegenüber Medium gesteigert. In allen verwendeten IL-26-Konzentrationen konnte in der Kontrolle mit Mock-Infektion ein deutlicher Anstieg der SOCS-3-Expression gegenüber Medium gezeigt werden. Polybren führte zu einer verminderten Expression, wohingegen diese in der IFN- α -Kontrolle vergleichbar mit Medium war. Die Gesamtmengen an cDNA waren bei homogener Verteilung der Banden des Haushaltsgenes GAPDH jeweils vergleichbar.

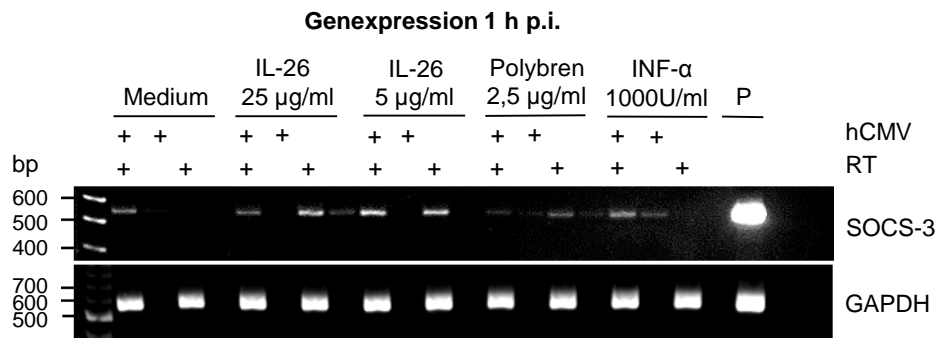


Abb. 18: Genexpression von SOCS-3 in Abhängigkeit von IL-26. Primäre Fibroblasten wurden nach Vorbehandlung mit IL-26, Polybren oder INF-α mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert. Nach 1 h p.i. wurden Gesamt-RNA-Proben gewonnen und die Expression von SOCS-3 in einer RT-PCR bestimmt. Die folgenden Primer wurden verwendet: SOCS-3 (2266/2267, 566 bp, 36 Zyklen) und GAPDH (2371/2372, 566 bp, 23 Zyklen). P=Positivkontrolle. Jeweils eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase erfolgte zum Ausschluss einer Verunreinigung mit genomischer DNA.

IL-26 führt somit zu einer schwachen Induktion der SOCS-3-Expression unabhängig von einer Infektion mit hCMV. Nach Infektion mit dem Virus fällt dieser Effekt in hohen IL-26-Konzentrationen geringer aus.

Zur Bestimmung der Effektstärke der IL-26-induzierten Genexpression hCMV-infizierter primärer Fibroblasten wurde die Expression von IFN-β1, MxA und GAPDH in einer quantitativen RT-PCR gemessen. Gesamt-RNA-Proben wurden nach 6 und 24 h p.i. nach Vorbehandlung mit Medium, IL-26-Dialysepuffer und IL-26 gewonnen. Als Vergleichssubstanz wurde das Zytokin IL-2 verwendet. Mit dem *relative-expression software tool* (Pfaffl et al., 2002) wurde die relative Expression bezogen auf Medium nach Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH bestimmt (Abb. 19).

Nach 6 h p.i. war die Expression von IFN-β1 bei einer verwendeten IL-26-Konzentration von 25 µg/ml gegenüber Medium etwa 3x gesteigert. Der IL-26-Dialysepuffer, IL-2 oder IL-26 in niedriger Konzentration hatten keinen Einfluss auf die IFN-β1-Expression. Nach 24 h p.i. ließ sich eine 6x Zunahme der Expression nach Behandlung mit IL-26 in einer Konzentration von 25 µg/ml nachweisen. Eine IL-26-Konzentration von 5 µg/ml führte zu einer etwa 2x Zunahme der Expression. Auch der IL-26-Dialysepuffer steigerte die Expression auf etwa das Zweifache, wohingegen IL-2 keinen detektierbaren Einfluss ausübte.

Die relative Genexpression von MxA wurde durch IL-26 in hoher Konzentration nach 6 h p.i. etwa 1,5x und nach 24 h p.i. etwa 2x gesteigert. In niedriger Konzentration führte IL-26 nach 6 h p.i. zu keiner und nach 24 h p.i. zu einer etwa 1,5x verstärkten Expression. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen zu IFN-β1 war die Expression von MxA nach Behandlung mit dem IL-26-Dialysepuffer 24 h p.i. 1,5x erhöht. IL-2 wies keinen Effekt auf die Genexpression auf.

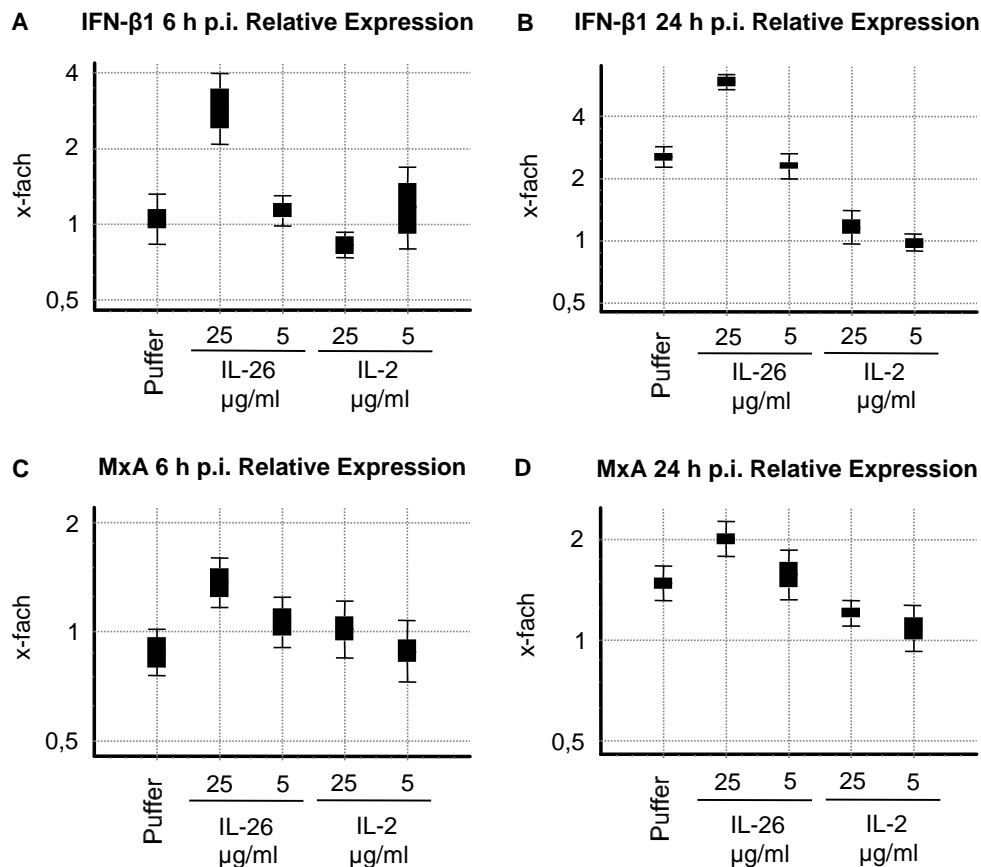


Abb. 19: Relative Expression von IFN-β1 und MxA im Vergleich zu Medium. Primäre Fibroblasten wurden nach Vorbehandlung mit IL-26-Dialysepuffer, IL-26, oder IL-2 mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert. Nach 6 und 24 h p.i. wurde Gesamt-RNA gewonnen und die Expression von IFN-β1, MxA und GAPDH in der quantitativen-RT-PCR bestimmt. Mit dem *relative-expression software tool* wurde die relative Expression der Gene in Bezug auf Medium nach Normalisierung auf das Haushaltsgen GAPDH bestimmt. A) IFN-β1-Expression 6 h p.i., B) IFN-β1-Expression 24 h p.i., C) MxA-Expression 6 h p.i. und D) MxA-Expression 24 h p.i.

In der quantitativen-PCR wurde gezeigt, dass IL-26 zu einer Konzentrations-abhängigen Verstärkung der IFN-β1- und, zu einem geringeren Grad, auch der MxA-Expression hCMV-infizierter primärer Fibroblasten führt. Das Vergleichszytokin IL-2 hatte keinen Einfluss auf die Genexpression.

5.8 Bestimmung der IFN-β1-Konzentration im Zellkulturüberstand

Da IL-26 die IFN-β1-Genexpression hCMV-infizierter primärer Fibroblasten verstärkt, wurde zur Bestätigung dieser Beobachtung die Konzentration von IFN-β1-Protein im Kulturüberstand infizierter Zellen in einem spezifischen ELISA gemessen. Dazu wurden die Zellen mit Medium oder IL-26 vorbehandelt und anschließend mit hCMV mit MOI = 0,03 infiziert. Außerdem erfolgte jeweils eine Kontrolle mit hCMV- oder Mock-Infektion und die MOI wurde, abweichend zu den Voruntersuchungen, höher gewählt, damit eine im ELISA nachweisbare IFN-β1-Konzentration erreicht werden konnte. Nach 6, 24 und 48 h p.i. wurden die Zellkulturüberstände asserviert und die IFN-β1-Konzentration im ELISA bestimmt. Die Konzentration

wurde anhand einer Standardkurve im Mikrotiterplatten-Fluorimeter bestimmt (Abb. 20). Nach 6 h p.i. war in allen Gruppen eine Erhöhung der IFN- β 1-Konzentration nicht messbar. Nach 24 h p.i. war die Menge an IFN- β 1 nach Vorbehandlung mit IL-26 gegenüber Medium nach hCMV-Infektion nahezu verdoppelt. Der Unterschied war statistisch signifikant. Nach 48 h p.i. war noch eine leicht erhöhte IFN- β 1-Konzentration nach IL-26-Gabe nachweisbar, jedoch wies dies keine Signifikanz mehr auf. Nach Mock-Infektion konnte eine erhöhte IFN- β 1-Konzentration nicht gemessen werden.

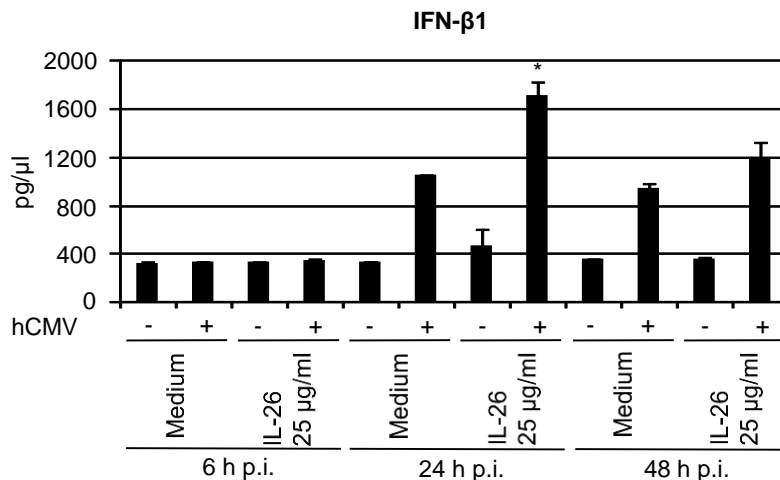


Abb. 20: Bestimmung der IFN- β 1-Konzentration in Zellkulturüberständen hCMV-infizierter Fibroblasten. Primäre Fibroblasten wurden mit Medium oder IL-26 in einer Konzentration von 25 μ g/ml vorbehandelt und anschließend mit hCMV (MOI = 0,03) infiziert. Zusätzlich erfolgte jeweils eine Mock-Infektion. Die Zellkulturüberstände wurden nach 6, 24 und 48 h p.i. gewonnen und die IFN- β 1-Konzentration wurde in einem spezifischen ELISA in pg/ μ l bestimmt.

Die IFN- β 1-Konzentration im Zellkulturüberstand hCMV-infizierter Fibroblasten wird durch IL-26 deutlich gesteigert. Dieser Effekt steht in Übereinstimmung mit den RNA-Ergebnissen und ist nach 24 h p.i. am stärksten ausgeprägt, dagegen bereits nach 48 h p.i. deutlich reduziert.

5.9 Nachweis von hCMV-Proteinen im Immunblot

Die hCMV-Replikation gliedert sich in drei Phasen. Diese Phasen werden als *immediate early* (IE), *delayed early* (DE) und *late* (L) bezeichnet. In jeder Phase der Replikation werden spezifische virale Proteine exprimiert. Im Immunblot wurde untersucht, ob IL-26 die Expression viraler Proteine oder die Replikationsphasen von hCMV beeinflusst. Der Proteinnachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen repräsentative Vertreter jeder Replikationsphase. Für die IE-Phase wurde pp72 (72 kDa), für die DE-Phase pp65 (65 kDa) und für die L-Phase die DNA-Polymerase Untereinheit pp52 (52 kDa) untersucht. Als Kontrollproteine wurden die Haushaltsproteine β -Actin und STAT-3 analysiert. Primäre Fibroblasten wurden nach Vorbehandlung über 5 min mit IL-26, Medium oder GCV hCMV- oder Mock-infiziert. An d 3-8 p.i. wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate in einem SDS-PAGE aufgetrennt. Im

Immunblot wurden dann die Zielproteine mit Primärantikörpern markiert und diese mit einem Sekundärantikörper in einer Lumineszenzreaktion nachgewiesen und mit einer CCD-Kamera dokumentiert (Abb. 21).

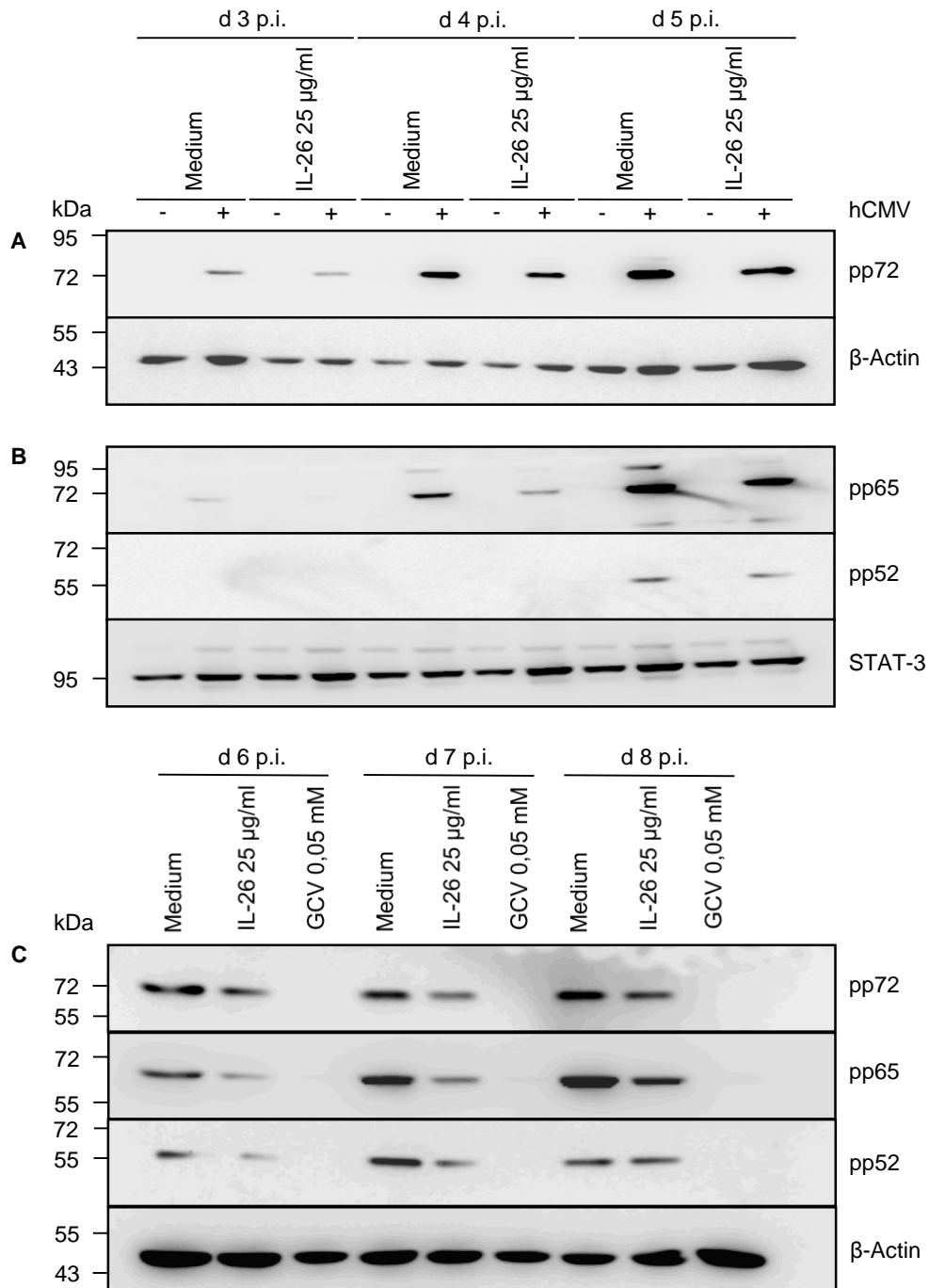


Abb. 21: Nachweis von hCMV-Proteinen im Immunblot in Abhängigkeit von IL-26. Primäre Fibroblasten wurden mit Medium, GCV oder IL-26 vorbehandelt und mit hCMV (MOI = 0,003) infiziert. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Zellysate in einem SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine auf eine Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dieselbe Membran wurde nach denaturierendem Waschen jeweils erneut verwendet. A) Nachweis von pp72 an d 3 bis d 5 p.i. im Vergleich zum Haushaltsprotein β -Actin, B) Nachweis von pp65 und pp52 an d 3-5 p.i. im Vergleich zu dem Haushaltsprotein STAT-3, C) Nachweis von pp72, pp65 und pp52 an d 6-8 p.i. im Vergleich zu β -Actin.

Das IE-Protein pp72 war bereits an d 3 p.i. zu detektieren. Dabei war die Signalintensität der Banden und damit des Gehaltes viraler Proteine nach Behandlung mit IL-26 schwächer ausgeprägt als in der Mediumkontrolle. Dieser Unterschied blieb bis d 8 p.i. bestehen. Das DE-Protein pp65 konnte ab d 4 p.i. nachgewiesen werden. Die pp65-Menge war wie bei den Ergebnissen mit pp72 nach IL-26-Behandlung über den gesamten Untersuchungszeitraum vermindert. Der gleiche Zusammenhang konnte für das L-Protein pp52 gezeigt werden, das ab d 5 p.i. nachgewiesen werden konnte. An d 8 p.i. war die Proteinmenge jedoch, im Gegensatz zu den vorherigen Beobachtungen, angeglichen und es konnte kein Unterschied mehr gezeigt werden. Nach Behandlung mit GCV waren keine viralen Proteine nachweisbar. Für die Haushaltsproteine β -Actin und STAT-3 zeigte sich, mit wenigen Ausnahmen, eine gleichmäßige Verteilung. In den Kontrollen mit Mock-Infektion waren virale Proteine nicht nachweisbar.

IL-26 bewirkte in den hCMV-Infektionsexperimenten also eine Verminderung der viralen Proteinmengen. Dabei war dieser Effekt über die verschiedenen Phasen der viralen Infektion etwa gleich stark ausgeprägt, so dass eine Beeinflussung einer speziellen Replikationsphase durch IL-26 nicht gezeigt werden konnte. Lediglich die Gesamtmenge viraler Proteine war durch eine reduzierte Anzahl infizierter Zellen vermindert.

6 Diskussion

6.1 Antiviraler Effekt von IL-26

Das Zytokin IL-26 wurde als Homolog zu IL-10 aufgrund seiner Überexpression durch T-Zellen entdeckt, die mit Herpesvirus saimiri transformiert waren (Knappe et al., 2000). Das IL-26-Gen ist in unmittelbarer Nähe zu IL-22 und IFN- γ auf Chromosom 12 in gleicher Orientierung in Richtung auf das Zentromer hin lokalisiert (Knappe et al., 2000; Dumoutier et al., 2000b). IL-26 wird hauptsächlich von T-Zellen exprimiert (Knappe et al., 2000; Wolk et al., 2002). Die Hauptzielzellen sind epitheliale Zellen (Hör et al., 2004; Nagalakshmi et al., 2004b; Sheikh et al., 2004; Dambacher et al., 2009). Eine IL-26R-Expression konnte in Immunzellen nicht nachgewiesen werden (Blumberg et al., 2001; Wolk et al., 2002; Sheikh et al., 2004). Die biologischen Funktionen sind noch wenig bekannt. Aufgrund der Koexpression mit IL-22 und IFN- γ durch Th1-Zellen könnte IL-26 eine Bedeutung in der Abwehr viraler Infektionen haben (Wilson et al., 2007; Manel et al., 2008). IL-26 wird außerdem von Th17-Zellen exprimiert, die bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis vulgaris, Rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn nachgewiesen werden und Bestandteil der aktuellen Forschung sind (Pène et al., 2008). In den Voruntersuchungen zu dieser Arbeit zeigten sich in Zellkultur-Infektionsmodellen für IL-26 sowohl Replikations-fördernde als auch antivirale Effekte bei Viren unterschiedlicher Virusklassen (Braun et al., 2013). Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von IL-26 auf die hCMV-Infektion in Kulturen primärer Fibroblasten zu untersuchen. Dazu wurde eine hCMV-Rekombinante mit genomisch integriertem GFP-Gen verwendet (Marschall et al., 2000). Der Nachweis der viralen Infektion erfolgte anhand der fluoreszierenden Eigenschaften des GFP.

Als Vergleichsprotein zu IL-26 wurde humanes IL-2 verwendet. Mit einem Molekulargewicht von 26 kDa weist IL-2 im Vergleich zu IL-26 eine ähnliche Größe auf (Welte & Mertelsmann, 1985). IL-26 hat jedoch aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung mit mehreren Lysin- und Argininresten eine stark positive Ladung mit einem berechneten isoelektrischen Punkt von 10,77 (Knappe et al., 2000). Der isoelektrische Punkt von IL-2 liegt dagegen bei 6,7 (Welte & Mertelsmann 1985). IL-2 unterstützt in vitro die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen. Deshalb wurde IL-2 zunächst als *T-cell growth factor* bezeichnet (Gillis & Smith, 1977; Gillis et al., 1978; Morgan et al., 1976; Smith, 1988). IL-2 wird vorwiegend durch aktivierte T-Zellen, insbesondere CD4⁺ T-Helferzellen gebildet (Keene & Forman, 1982). Auch in vivo nimmt IL-2 eine wichtige Rolle in der Antigen-induzierten klonalen Expansion von T-Zellen ein. (Keene & Forman, 1982). IL-2 weist neben seinen immunverstärkenden Funktionen auch antiinflammatorische Eigenschaften auf. Ähnlich wie IFN- γ führt IL-2 zu einer Suppression von Th17-Zellen und konsekutiv zu einer Reduktion der IL-17-Zytokinproduktion (Laurence et al., 2007). Zudem kommt es zu der Stimulation regulatorischer T-

Zellen, welche eine wichtige Rolle in der immunologischen Selbsttoleranz und der Immunregulation einnehmen (Klebb et al., 1996; Papiernik et al., 1998; Suzuki et al., 1999; Wolf et al., 2001; D'Cruz & Klein, 2005; Fontenot et al., 2005).

In den Experimenten dieser Arbeit fiel auf, dass nach IL-26-Vorbehandlung der Zellen und anschließender hCMV-Infektion in der Fluoreszenzmikroskopie an d 6 p.i. Konzentrationsabhängig weniger Zellen virusinfiziert waren und eine GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Dieser Effekt war am stärksten bei einer IL-26-Konzentration von 25 µg/ml ausgeprägt und nahm mit sinkender Konzentration ab. Im Vergleich hierzu hatte IL-2 keinen Einfluss auf die Anzahl fluoreszierender Zellen (Abb. 2). Zur Quantifizierung dieses Effektes erfolgte, analog zur Fluoreszenzmikroskopischen Auswertung, die Untersuchung in der Durchflusszytometrie und per Virustitration. In den durchflusszytometrischen Ergebnissen zeigte sich eine signifikante Konzentrations-abhängige Reduktion der Anzahl GFP-positiver, virusinfizierter Zellen nach IL-26-Vorbehandlung. Die Effektstärke nahm jedoch von d 4 bis 6 p.i. kontinuierlich ab, war jedoch an d 6 immer noch statistisch signifikant (Abb. 3). Bei der Bestimmung der Virustiter aus den gewonnenen Zellkulturüberständen zeigte sich ein vergleichbarer Effekt zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie. Im Gegensatz hierzu ließ sich jedoch keine Abschwächung des Effektes über die Zeit beobachten. Die Virustitration erfolgte dabei auf primären Fibroblasten. In allen Untersuchungen konnte für das Vergleichsprotein IL-2 kein erkennbarer Einfluss auf die Virusinfektion gezeigt werden (Abb. 4).

Durch die Verwendung eines IL-26-spezifischen polyklonalen Kaninchen-Serums wurde versucht, den antiviralen Effekt von IL-26 aufzuheben. Durch Verwendung dieses Serums war eine Blockade der IL-26-abhängigen STAT-Phosphorylierung in der IL-26-responsiven Kolonkarzinom-Zelllinie Colo-205 möglich (Hör et al., 2004; Braum, 2013). In den durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen ließ sich jedoch kein Einfluss auf die Anzahl hCMV-infizierter Zellen nach Vorinkubation von IL-26 mit dem Serum im Vergleich zur PBS-Kontrolle nachweisen. Der Konzentrations-abhängige antivirale Effekt von IL-26 wies in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 12). Dies ist möglicherweise durch die vergleichsweise hohen eingesetzten Zytokinkonzentrationen zu erklären, welche einer kompletten Neutralisierung des IL-26-Effektes entgegenwirkten. Ein antiviraler Effekt auf die hCMV-Infektion konnte erst bei IL-26-Konzentration zwischen 5 und 25 µg/ml bestätigt werden. Im Vergleich hierzu ließen sich bei Untersuchungen zum Vesikulären Stomatitis-Virus aus der Gruppe der Rhabdoviridae bereits bei um das 25-fache niedrigeren Konzentrationen signifikante Replikations-fördernde Effekte detektieren (Braum, 2013; Braum et al., 2013).

6.2 Unabhängigkeit des Effektes vom IL-26-Rezeptor

Der IL-26R ist ein heterodimerer Rezeptor, der aus der Liganden-bindenden Rezeptorkette IL-20R1 und der akzessorischen Rezeptorkette IL-10R2 besteht (Hör et al., 2004; Sheikh et al., 2004). Nach der Bindung von IL-26 an IL-20R1 kommt es zur Anlagerung von IL-10R2 und zu der Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und STAT-3 durch die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase JAK1 und Tyk2 (Hör et al., 2004).

Da IL-10R2 von nahezu allen humanen Zellen exprimiert wird (Aggarwal et al., 2001; Wolk et al., 2002), ist die IL-20R1-Expression ausschlaggebend dafür, ob eine Zelle gegenüber IL-26 responsiv ist. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass IL-20R1 vorwiegend auf epithelialen Zellen exprimiert und in hohem Maße in der Haut und der Kolonmukosa gebildet wird (Hör et al., 2004; Nagalakshmi et al., 2004; Sheikh et al., 2004; Dambacher et al., 2009). Deshalb wurde untersucht, ob primäre Fibroblasten einen funktionellen IL-26R exprimieren. Dazu wurde zelluläre Gesamt-RNA isoliert und die RNA-Expression der einzelnen Rezeptorketten in der RT-PCR bestimmt. Zum Nachweis von IL-20R1 wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet. In der PCR erfolgte die Amplifikation der revers transkribierten cDNA-Proben über 36 Zyklen. Nach Auftrennung im Agarosegel kamen mit dem Primerpaar 2339/2340 an erwarteter Stelle nur sehr schwache Banden und mit dem Primerpaar 2331/2332 keine Banden zur Darstellung. Dahingegen zeigte sich eine starke Expression für IL-10R2 (Abb. 15).

Da es nach Bindung von IL-26 an seinen Rezeptor in der Signaltransduktion zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT-1 und STAT-3 kommt, wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob die Behandlung primärer Fibroblasten mit IL-26 zu einer STAT-Aktivierung führt. Hierzu wurden die Zellen mit IL-26 behandelt und nach 20, 40 und 60 min wurden Zelllysate gewonnen. In einem Immunblot wurden anschließend die phosphorylierten Formen von STAT-1 und STAT-3 detektiert. Nach Behandlung mit IL-26 kam es bei primären Fibroblasten im Vergleich zu Medium zu keiner STAT-Phosphorylierung. Im Vergleich hierzu erfolgte bei der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Colo-205, die beide Ketten des IL-26R exprimiert (Hör et al., 2004), ein deutlicher Nachweis von pSTAT-3 und zu einem geringeren Teil auch pSTAT-1 (Abb. 16). Hieraus kann geschlossen werden, dass primäre Fibroblasten trotz einer geringen Expression von IL-20R1-RNA keinen funktionellen IL-26R ausbilden, da es auf Proteinebene zu keiner detektierbaren STAT-Phosphorylierung kommt. Der antivirale Effekt von IL-26 wird daher nicht über den IL-26R vermittelt.

In Zellkultur und wahrscheinlich auch in vivo befindet sich IL-26 vorwiegend Zell-assoziiert. Dies wird vermutlich durch die positive Ladung von IL-26 mit einem isoelektrischen Punkt von 10,77 bedingt (Knappe et al., 2000). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass IL-

26 an verschiedene Glykosaminoglykane bindet. Die IL-26-bedingte STAT-Phosphorylierung konnte z.B. durch Heparin inhibiert werden. Dabei zeigten sich jedoch Unterschiede in Bezug auf die Struktur der verwendeten Glykosaminoglykane. Die Bindungsaffinität ist also nicht allein durch die Ladung bedingt, sondern wird ebenfalls vom strukturellen Aufbau der Glykosaminoglykane beeinflusst (Hör et al., 2004). Auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen sind in der Glykokalyx eine Vielzahl verschiedener Glykoproteine lokalisiert, welche vergleichbare Eigenschaften wie Glykosaminoglykane aufweisen. Hierdurch könnten durch die Bindung von IL-26 an der Zelloberfläche lokal stark erhöhte Zytokin-Konzentrationen entstehen. Analog wäre es denkbar, dass die Affinität von IL-26 zu Zell- oder Virus-Oberflächen diejenige seiner Antikörper deutlich übersteigt und somit die Antikörper-Inhibitions-Versuche hier erfolglos verliefen.

hCMV hat die Fähigkeit, an eine große Zahl verschiedener Körperzellen zu binden, auch wenn eine Replikation des Virus in diesen nicht stattfindet. Diese Bindung erfolgt über Heparansulfate, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind (Compton & Fiere, 2006; Mocarski, 2006b). Es wird angenommen, dass es unter Einbeziehung weiterer zellulärer Rezeptoren zu einer Fusion mit der Zielzelle kommt. Diese Theorie wird durch eine zweiphasige Bindungscharakteristik von hCMV an Fibroblasten unterstützt (Boyle & Compton, 1998). Das hCMV-Glykoprotein B in der Hülle des Virus wird als essentiell bei der Bindung an diese Heparansulfate angesehen (Mocarski & Courcelle, 2001; Compton & Fiere, 2006).

Eine mögliche Ursache für den antiviralen Effekt von IL-26 könnte dadurch bedingt sein, dass IL-26 durch seine Bindung an der Zelloberfläche die für hCMV erforderlichen Bindungsstellen besetzt und somit als Antagonist zu hCMV fungiert. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass der antivirale Effekt von IL-26 nur bei niedriger MOI nachweisbar ist (Abb. 5, 6). Bei höherer MOI wurde kein Effekt auf hCMV nachgewiesen. Durch eine erhöhte Anzahl infektiöser Viruspartikel könnte es durch einen kompetitiven Antagonismus und eines deutlichen Überwiegens von hCMV zu einer vermehrten Bindung und Fusion mit der Zielzelle durch hCMV kommen.

In den nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Vorinkubation entweder der Zellen oder von hCMV einen Einfluss auf die Infektion ausübt. Dazu wurden primäre Fibroblasten oder hCMV jeweils für 30 min vorinkubiert. In der Auswertung ließen sich in den beiden Gruppen keine Unterschiede in Bezug auf die Anzahl GFP-positiver virusinfizierter Zellen nachweisen (Abb. 9). In einem weiteren Experiment wurde zudem untersucht, ob eine Vorinkubation der Zellen mit hCMV oder eine Vorinkubation der Zellen mit IL-26 jeweils über 2,5 h einen Einfluss auf die virale Infektion im Vergleich zu einer Vorinkubation über 5 min ausübt. In der Gruppe mit einer Vorinkubation der Zellen mit IL-26 für 2,5 h ergab sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu einer Vorinkubation über 5 min und die Ergebnisse

der Voruntersuchung konnten somit bestätigt werden. Allerdings fiel ein deutlich erhöhter Anteil GFP-positiver Zellen auf, wenn die Fibroblasten zunächst zusammen mit hCMV für 2,5 h vorinkubiert wurden. Der antivirale Effekt von IL-26 fiel hier geringer aus (Abb. 10). Diese Daten lassen vermuten, dass die antiviralen Eigenschaften von IL-26 vor allem in der Frühphase der viralen Infektion von Bedeutung sind.

Die antivirale Wirkung von IL-26 könnte durch elektrostatische Wechselwirkungen des kationischen IL-26 bedingt sein. Als Vergleichssubstanz zu IL-26 wurde hierzu das synthetische kationische Polymer Polybren untersucht. Dieses weist wie IL-26 eine positive Ladung auf. Polybren führt bei verschiedenen Retroviren zu einer Steigerung der Infektionseffizienz. Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer Reduzierung der Ladungsabstoßung zwischen Virus und Zellmembran (Davis et al., 2002 und 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass verschiedene weitere, positiv geladene Proteine einen Einfluss auf die Infektion mit bestimmten Viren haben. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass das Peptid *semen-derived enhancer of virus infection* (SEVI), ein Fragment der prostataspezifischen sauren Phosphatase, Fibrillen ausbildet, welche eine Infektion mit dem HIV drastisch erhöhen (Münch et al., 2007). SEVI weist aufgrund positiv geladener Aminosäurereste wie Lysin und Arginin mit einem pH-Wert von 10,21 einen ähnlichen isoelektrischen Punkt wie IL-26 auf. Diese Aminosäurereste führen wahrscheinlich über die Neutralisierung von elektrostatischen Abstoßungsreaktionen zu einer verbesserten Bindung und Fusion des Virus mit der Zielzelle. In Übereinstimmung zu den Beobachtungen zu IL-26 konnte der durch SEVI bedingte Effekt durch Zugabe von Polyanionen wie Heparin und anderer Glykosaminoglykane inhibiert werden (Roan et al., 2009). Defensine sind eine weitere Gruppe kationischer Peptide, welche zur Abwehr bakterieller und auch viraler Infektionen an Haut und Schleimhautoberflächen gebildet werden (Hazrati et al., 2006; Crack et al., 2012). Im Gegensatz zu den Defensinen konnte bislang jedoch kein Effekt von IL-26 auf bakterielle Infektionen beobachtet werden. In den durchgeführten Infektionsexperimenten konnte, in Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen, unter Verwendung von Polybren in hohen Konzentrationen ebenfalls ein antiviraler Effekt auf die hCMV-Infektion beobachtet werden (Abb. 10).

Des Weiteren wurde untersucht, ob IL-26 einen Einfluss auf die Infektion primärer Fibroblasten mit dem HSV-1 ausübt. Hierzu wurden die Zellen mit IL-26 oder Polybren vorbehandelt und mit HSV-1 in einer MOI = 0,003 wie in den Experimenten mit hCMV infiziert. Bei der Auswertung der GFP-Fluoreszenz mittels Mikrotiterplatten-Fluorimeter und Durchflusszytometrie zeigte es sich, dass die Infektion nicht durch IL-26 beeinflusst wird (Abb. 13, 14). Jedoch konnte in den Untersuchungen am Mikrotiterplatten-Fluorimeter gemessen werden, dass Polybren die optische Dichte und somit das Ausmaß der GFP-Fluoreszenz

Konzentrations-abhängig reduzierte (Abb. 13). Polybren hat somit einen antiviralen Effekt sowohl auf hCMV als auch auf HSV-1.

Zusammenfassend lassen die gesammelten Daten vermuten, dass es durch IL-26 wahrscheinlich zu elektrostatisch bedingten Wechselwirkungen zwischen dem Virus und der Zelloberfläche während der Adsorption des Virus an die Zielzelle kommt. Dies wird auch dadurch bekräftigt, dass der IL-26-Effekt nach Vorinkubation der Zellen mit hCMV deutlich geringer ausfällt. Dies spricht für eine Bedeutung von IL-26 in der Frühphase der viralen Infektion. Die Wechselwirkungen weisen eine Virus- und Reagenzienspezifität auf. Während die Replikation von hCMV durch IL-26 inhibiert wird, zeigte sich HSV-1 unbeeinflusst; hingegen wird die Infektion und Replikation des Vesikulären Stomatitis-Virus durch IL-26 deutlich verstärkt (Braun, 2013; Braun et al., 2013). Für Polybren konnte ein antiviraler Effekt sowohl gegen hCMV als auch HSV-1 nachgewiesen werden. Dahingegen übte IL-26 einen hemmenden Effekt lediglich auf hCMV aus. Interessanterweise führte über 10 min bei 95°C hitzedenaturiertes IL-26 zu einem ähnlich starken Effekt wie nicht denaturiertes IL-26 (Abb. 10). Diese Beobachtung untermauert die Vermutung, dass die Ladung von IL-26 eine entscheidende Rolle für die Wirkung der Substanz hat.

6.3 Virale Proteinexpression

Die Replikation von hCMV wird in drei Phasen IE, DE und L unterteilt. In jeder Phase werden verschiedene virale Gene exprimiert. Die IE-Phase beginnt unmittelbar nach Translokation des viralen Genoms in den Zellkern. Nach etwa 6 h p.i. beginnt die DE-Phase, in der ein Großteil des viralen Genomes transkribiert wird (Dworsky et al., 1983; Yu et al., 2003). Diese geht nach 24-36 h in die L-Phase über, in der nach 3-4 d die maximale Freisetzung von Viruspartikeln erreicht wird (McCormick et al., 2005; McCormick & Mocarski, 2006).

Der Einfluss von IL-26 auf die einzelnen Phasen der Virusreplikation wurde im Immunblot durch Nachweis viraler Proteine mithilfe spezifischer Antikörper untersucht. Antikörper gegen jeweils ein repräsentatives Protein jeder Replikationsphase wurden verwendet. Als Vertreter der IE-Phase wurde pp72, für die DE-Phase pp65 und für die L-Phase die DNA-Polymerase-Untereinheit pp52 bestimmt. Die primären Fibroblasten wurden nach kurzer IL-26-Vorinkubation mit hCMV infiziert und Zelllysate wurden an verschiedenen Tagen gewonnen. Als Vergleich wurden die Haushaltsproteine β -Actin und STAT-3 dargestellt. An d 3 und 4 p.i. waren die Proteine pp72 und pp65 nachweisbar. Das L-Phase Protein pp52 konnte erst ab d 5 p.i. detektiert werden (Abb. 21). Allen drei Proteinen gemeinsam war ein Unterschied in der Signalintensität zwischen Medium und IL-26. So war nach Vorbehandlung mit IL-26 das Signal schwächer und dementsprechend die Menge der viralen Proteine geringer. Dieser Effekt schwächte sich jedoch bis d 8 p.i. leicht ab. Das Verhältnis der Signalintensität blieb

über die Zeit und zwischen den untersuchten Proteinen der einzelnen Replikationsphasen erhalten. Daher ließ sich ein Effekt von IL-26 auf einzelne Schritte innerhalb der Replikation des Virus nicht ausmachen. Der geringere Proteingehalt spricht in Zusammenschau mit den oben beschriebenen Effekten lediglich dafür, dass eine geringere Anzahl der Zellen durch hCMV infiziert wurde, weil IL-26 am ehesten die Frühphase der Infektion inhibiert.

6.4 Expression antiviraler Gene in Abhängigkeit von IL-26

Die Genexpression hCMV-infizierter primärer Fibroblasten wurde im Weiteren analysiert, damit alternative Ursachen der antiviralen Eigenschaften von IL-26 ergründet werden konnten. Hierbei sollte insbesondere geklärt werden, ob der antivirale Effekt von IL-26 durch Induktion antiviraler Gene zustande kommt. Der Fokus wurde hierbei auf die Genexpression von IFN- β und IFN-responsiven Genen gelegt.

IFNe sind eine Gruppe multifunktionaler Zytokine, welche als Mediatoren einer zellulären Resistenz gegen virale Infektionen entdeckt wurden. IFNe haben verschiedene Funktionen in der Immunantwort gegen Pathogene, in der Immunmodulation und bei der Differenzierung hämatopoetischer Zellen (Nguyen et al., 1997; Stark et al., 1998). Die Typ-I-IFNe IFN- α und IFN- β werden von virusinfizierten Zellen exprimiert und bilden die primäre Immunantwort der Wirtszelle. Das Typ-II-IFN IFN- γ wird dagegen hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert und ist somit Teil des adaptiven Immunsystems. IFNe führen zur transkriptionellen Aktivierung verschiedener Zielgene. Die Aktivität wird über *IFN-regulatory-factors* (IRFs) gesteuert (Nguyen et al., 1997). Die Gesamtheit der durch IFN-induzierten Gene wird auch als *IFN-stimulated genes* (ISGs) zusammengefasst (Staehele, 1990). Zu den Genen, die für die antiviralen Eigenschaften der Typ-I-IFNe verantwortlich gemacht werden, zählen unter anderem MxA, 2'5'-OAS und PKR (Brierley & Fish, 2002).

Neben IRF-1 konnte SOCS-3 in der IL-26-responsiven Tumorzelllinie Colo-205 als durch IL-26 induzierbares Gen nachgewiesen werden. Die Expression war bereits 30 min nach Zytokingabe messbar und normalisierte sich nach 2 h wieder auf den Ausgangswert (Braun, 2013; Braun et al., 2013). SOCS-3 wird auch durch die Typ-I-IFNe IFN- α/β und IFN- λ induziert (Vlotides et al., 2004). Zur Gruppe der IFN- λ zählen drei IFNe, die aufgrund ihres strukturellen Aufbaus zur IL-10-Zytokin-Familie gezählt werden und alternativ als IL-28A, IL-28B und IL-29 bezeichnet werden (Kotenko et al., 2003; Sheppard et al., 2003). Diese durch IL-26 induzierte SOCS-3-Transkription beeinflusst möglicherweise die IFN-Antwort der Zellen und wirkt somit auf die virale Infektion.

In den Infektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass mit IL-26 vorbehandelte primäre Fibroblasten nach Infektion mit hCMV eine verstärkte IFN- β 1-Genexpression gegenüber der

Mediumkontrolle aufwiesen. Dieser Effekt war Konzentrations-abhängig und nahm mit steigenden IL-26-Konzentrationen zu (Abb. 17). Polybren führte hingegen zu einer Abnahme der IFN- β 1-Expression. Dieser Effekt war sowohl 6 h p.i. als auch 24 h p.i. nachweisbar. Im Weiteren wurden durch Typ-I-IFN induzierbare Gene untersucht. Als Positivkontrolle wurde IFN- α verwendet. Eine positive Korrelation zur Zunahme der IFN- β 1-Expression nach Vorbehandlung mit IL-26 wiesen MxA, 2'5'-OAS und ISG15 auf. Dabei führte die Gabe von IL-26 auch ohne eine hCMV-Infektion nach 6 h p.i. zu einer vermehrten MxA-Expression gegenüber der Mediumkontrolle. Dieser Effekt kehrte sich nach 24 h p.i. um und es war in der Mediumkontrolle gegenüber IL-26 eine verstärkte Expression zu detektieren. Polybren führte nach 6 h p.i. zu einer Abschwächung der Expression von MxA, 2'5'-OAS und ISG15. Jedoch waren 24 h p.i. zwischen Medium und Polybren keine Unterschiede mehr zu verzeichnen. Die Expression der PKR und des IRF-1 wurde weder durch IL-26 noch durch Polybren beeinflusst. IFN- α führte erwartungsgemäß zu einer verstärkten Expression der untersuchten Gene, unabhängig von einer Infektion mit hCMV.

Zur Bestätigung und Quantifizierung der oben genannten Effekte auf die Genexpression erfolgte der Nachweis von IFN- β 1 und MxA in einer quantitativen-PCR. In den Infektionsexperimenten wurde als Vergleichsprotein IL-2 verwendet. Als Kontrollsubstanz kam der IL-26-Dialysepuffer zum Einsatz. Bei IL-26-Konzentrationen von 25 μ g/ml zeigten sich nach 6 h p.i. eine 3x und 24 h p.i. eine 6x erhöhte Expression von IFN- β 1 gegenüber der Mediumkontrolle. Bei einer IL-26-Konzentration von 5 μ g/ml konnte nach 6 h p.i. kein Einfluss und nach 24 h p.i. eine 2x erhöhte IFN- β 1-Expression gemessen werden (Abb. 19). Der IL-26-Dialysepuffer führte nach 24 h p.i. zu einer etwa 2x Verstärkung der Expression, was auf eine geringe bakterielle Lipopolysaccharid-Kontamination durch das in Bakterien exprimierte IL-26 hindeuten könnte. Die MxA-Expression wurde durch IL-26 in einem geringeren Ausmaße verstärkt. So wurde die Expression nach 6 h p.i. 1,5x und nach 24 h p.i. 2x verstärkt. Jedoch könnte das Ausmaß der Genexpression durch die Wahl der Untersuchungszeitpunkte falsch niedrig sein. Da MxA erst durch die Freisetzung von IFN- β 1 induziert wird, könnte die maximale Expressionszunahme später als 24 h p.i. auftreten. IL-2 wies hingegen keinen Einfluss auf die Expression von IFN- β 1 und MxA auf.

Der Wirkmechanismus, über den IL-26 zu einer Verstärkung der IFN- β 1-Expression führt, ist noch unbekannt. IL-26 alleine führte im Vergleich zu Medium zu keiner Veränderung der IFN- β 1-Expression. Dieser Effekt wurde ausschließlich nach einer hCMV-Infektion beobachtet. Da primäre Fibroblasten keinen funktionellen IL-26R ausbilden, ist der Effekt außerdem unabhängig von IL-26R.

6.5 Klinische Bedeutung von Interleukin-26

Die biologischen Funktionen von IL-26 sind weitgehend unbekannt und Gegenstand der aktuellen Forschung. In mehreren Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass lokal erhöhte IL-26-Konzentrationen und Serumspiegel bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise Psoriasis vulgaris, Rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn vorkommen. Außerdem konnte eine Assoziation zwischen verschiedenen *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im IL-26-Gen oder dem IL-26-Genlocus mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Multiplen Sklerose, chronisch entzündlicher Darmerkrankungen oder einer Rheumatoiden Arthritis festgestellt werden. Diese Assoziationen waren teilweise geschlechtsspezifisch. Auch nach Transplantation hämatogener Stammzellen wird eine mögliche Rolle von IL-26 in der Pathogenese der *graft-versus-host disease* (GVHD) diskutiert. Diese Aspekte werden im Folgenden ausgeführt. Eine Übersicht der Erkrankungen mit einer Assoziation zu IL-26 gibt Tab. 16.

Erkrankung	Zellen	Pathogenese	Literaturangabe
Multiple Sklerose		Erhöhung des Erkrankungsrisikos von Frauen bei Vorliegen der SNPs D12S2510 und D12S2511 im IL-26-Genlocus	Goris et al., 2001; Vandenbroeck et al., 2003
Psoriasis vulgaris, Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn	Th17-Zellen	Koexpression von IL-17, IL-17F, IL-22, IL-26, TNF- α und den Chemokin-Rezeptor-6-Liganden <i>chemokine-(C-C motif)-ligand-20</i>	Pène et al., 2008
Morbus Crohn		Verstärkte Expression von IL-8, IL-22 und IL-26 in Gewebeproben entzündlicher Kolonläsionen, Erhöhung der IL-26-Serumkonzentration erkrankter Patienten, Assoziation mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bei Vorliegen des SNP rs2870946 im IL-26-Gen	Dambacher et al., 2009; Silverberg et al., 2010
Rheumatoide Arthritis	Fibroblasten- und Makrophagen-ähnliche Synoviozyten	Erhöhung der IL-26-Konzentrationen in Serum und Synovialflüssigkeit erkrankter Patienten, IL-26-abhängige Differenzierung von T-Zellen zu Th17-Zellen	Corvaisier et al., 2012
Hepatitis-C	CD3+ T-Zellen	Induktion der IFN- β - und IFN- γ -Expression in einem NK-Zell-Subtyp, Zunahme der TRAIL-Expression an der Oberfläche von NK-Zellen mit Steigerung der zytotoxischen Aktivität	Miot et al., 2014
<i>Graft-versus-host disease</i> (GVHD)	CD26+ CD4+ T-Zellen	Infiltration der Lunge bei GVHD-bedingter Bronchiolitis obliterans durch IL-26-exprimierende Zellen	Ohnuma et al., 2015

Tab. 16: Tabellarische Übersicht über die mit IL-26-assoziierten Erkrankungen mit Angabe der IL-26-exprimierenden Zelltypen, der Pathogenese und der Literaturangabe.

So haben genomweite Assoziationsstudien zur Identifikation des SNP rs2870946 im IL-26-Gen geführt, der mit der Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen assoziiert ist (Silverberg et al., 2010). Weitere SNPs wurden im Bereich des IL-26-Genlocus zwischen dem IFN- γ -Gen und dem IL-26-Gen entdeckt. Diese polymorphe Region wurde als potentiell wichtige Region für die Entwicklung einer Multiplen Sklerose beschrieben. Die SNPs

D12S2510 und D12S2511 im IL-26-Genlocus sind geschlechtsspezifisch mit der Entwicklung einer Multiplen Sklerose und der Rheumatoiden Arthritis assoziiert. Frauen haben gegenüber Männern bei Vorliegen eines der beiden SNPs ein erhöhtes Erkrankungsrisiko, wohingegen das Risiko für Männer unverändert bleibt (Goris et al., 2001; Vandenbroeck et al., 2003).

Im Gegensatz zu den antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-10 führt IL-26 nicht zu einer Inhibierung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-1 (Donnelly et al., 1999). IL-26 führt im Gegenteil sogar zu einer Hochregulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 in Keratinozyten und intestinalen Epithelzellen (Hör et al., 2004; Dambacher et al., 2009). IL-26 wird oft zusammen mit IL-22 koexprimiert, einem weiteren Vertreter der IL-10-Familie (Wolk et al., 2002; Nagalakshmi et al., 2004a). Verschiedene Subtypen von T-Zellen können IL-26 exprimieren. Die Expression konnte z.B. in Th1-Zellen detektiert werden, die IL-26 zusammen mit IFN- γ und IL-22 exprimieren (Wilson et al., 2007; Manel et al., 2008).

Eine klinische Bedeutung könnte IL-26 in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen einnehmen. Th17-Zellen, ein spezieller Subtyp der T-Zellen, konnten in Gewebeproben chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der Psoriasis vulgaris, der Rheumatoiden Arthritis oder dem Morbus Crohn als Produzenten einer Kombination aus IL-17, IL-17F, IL-22, IL-26, TNF- α und dem Chemokin-Rezeptor-6-Liganden *chemokine-(C-C motif)-ligand-20* identifiziert werden (Pène et al., 2008). In Studien mit Gewebeproben entzündlicher Kolonläsionen von Patienten mit der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn ließ sich eine erhöhte Expression von IL-26-mRNA nachweisen. Hierzu in Korrelation fand sich eine verstärkte Expression von IL-22 und IL-8. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa zeigte sich dieser Zusammenhang nicht. Außerdem konnten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöhte IL-26-Serumspiegel bei Patienten mit Morbus Crohn gemessen werden (Dambacher et al., 2009).

Die Rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunarthritis, die durch eine chronisch persistierende Entzündung im Bereich der Synovia, eine systemische Inflammation und Autoantikörper gekennzeichnet ist. Diese chronische Entzündung führt zu einer Schädigung des Gelenkknorpels und des Knochens (Scott et al., 2010). Die Rheumatoide Arthritis wird durch eine exzessive proinflammatorische Th1- und Th17-Zellantwort charakterisiert (Peck & Mellins, 2009; Lubberts, 2010). Bei an Rheumatoide Arthritis erkrankten Patienten konnten erhöhte IL-26-Konzentrationen im Serum und der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden. Zudem fanden sich erhöhte Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Immunhistochemische Untersuchungen konnten Fibroblasten- und Makrophagen-ähnliche Synoviozyten als die Hauptquelle von IL-26 ausmachen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von IL-26 zu einer Differenzierung von Gedächtnis-T-Zellen hin zum Phänotyp von CD4+ Th17-Zellen kommt. Dabei wird diese

Differenzierung vermutlich durch eine monozytäre IL-26-abhängige IL-1 β -Expression verursacht. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Monozyten für die Behandlung mit IL-26 empfindlich sind, obwohl eine Expression des IL-26R für Monozyten nicht detektiert werden konnte (Corvaisier et al., 2012). Aktuelle Therapiestrategien der Rheumatoiden Arthritis beinhalten unter anderem die Verwendung von Inhibitoren für TNF- α , IL-6 und IL-1 β (Quartier et al., 2011). Da die Expression von IL-1 β in Monozyten möglicherweise durch IL-26 bedingt ist, ergibt sich mit IL-26 ein neuer Ansatzpunkt für die Forschung zur Behandlung der Rheumatoiden Arthritis.

Die GVHD stellt eine bedeutende Komplikation nach hämatogener Stammzelltransplantation dar. Dabei ist die Bronchiolitis obliterans eine lebensbedrohliche Folge der GVHD (Filipovich et al., 2005). Aktuelle Untersuchungen in einem Mausmodell konnten zeigen, dass es bei der Bronchiolitis obliterans zu einer Infiltration der Lunge mit CD26+ und CD4+ T-Zellen kommt, die sowohl IL-26 als auch IFN- γ exprimieren. Analog zu den tierexperimentellen Untersuchungen, ließ sich in humanen Gewebeproben von Patienten mit Bronchiolitis obliterans im Rahmen einer GVHD die Infiltration der Lunge durch den selben Subtyp IL-26+ CD26+ CD4+ T-Zellen nachweisen. Eine Rolle von IL-26 in der Pathogenese dieser Erkrankung wird deshalb vermutet (Ohnuma et al., 2015).

Von klinischer Bedeutung könnte IL-26 zudem in der Pathogenese der Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) sein. HCV infiziert Hepatozyten und führt typischerweise zu einer chronischen Hepatitis. Diese Entzündung ist eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer Leberzirrhose und des Hepatozellulären Karzinoms (Seeff, 2009). In der derzeitigen Therapie der chronischen Hepatitis-C ist die Gabe von IFN- α noch ein wesentlicher Bestandteil (Soriano et al., 2009). Dabei wirkt IFN- α vorwiegend auf NK-Zellen, die durch Freisetzung zytotoxischer Moleküle und Apoptose-Induktion über den *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) für die Elimination HCV-infizierter Hepatozyten sorgen (Stegmann et al., 2010). Im Serum von Patienten mit chronischer Hepatitis-C, konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei der Rheumatoiden Arthritis, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöhte Serumspiegel von IL-26, IL-1 β und TNF- α detektiert werden. Eine erhöhte IL-26-Konzentration konnte ebenfalls bei Patienten mit einer Hepatitis-B nachgewiesen werden und korreliert mit dem Ausmaß der Erhöhung der Aminotransferasen-Konzentrationen. Eine IL-26-Expression in Hepatozyten wurde hierbei allerdings nicht beobachtet. Jedoch konnte in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass hier CD3+ T-Zellen IL-26 exprimieren. IL-26 führte in einer Subpopulation von NK-Zellen zu einer vermehrten Expression von IFN- β und IFN- γ . Außerdem bewirkte IL-26 eine Zunahme von TRAIL an der Zelloberfläche von NK-Zellen. Hierdurch konnte eine Verstärkung der zytotoxischen Wirkung von mit IL-26 aktivierten NK-Zellen in einer TRAIL-empfindlichen Zelllinie nachgewiesen werden. Dabei

war die durch IL-26 verstärkte Expression von TRAIL vergleichbar mit der durch IFN- α induzierten Verstärkung der TRAIL-Expression. Auch dieser Effekt ist unabhängig von IL-26R, da die Rezeptoruntereinheit IL-20R1 nicht von NK-Zellen exprimiert wird (Miot et al., 2014). Diese Ergebnisse zeigen, dass IL-26 zu einer NK-Zell-vermittelten Viruselimination führt. Damit könnte IL-26 möglicherweise einen therapeutischen Nutzen in der Therapie der chronischen Hepatitis-C aufweisen. Jedoch sind zur Beurteilung einer Einsetzbarkeit als therapeutisches Agens weitere Untersuchungen erforderlich.

Die klinische Bedeutung des Zytokins IL-26 ist derzeit insgesamt noch unklar. IL-26 ist in die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen involviert und es konnte gezeigt werden, dass es auch in der Abwehr viraler Infektionen eine Rolle spielt. Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass IL-26 einen antiviralen Effekt auf hCMV bei der Infektion primärer Fibroblasten hat. Dieser Effekt ist von IL-26R unabhängig. Der Wirkmechanismus ist derzeit noch unklar. IL-26 scheint jedoch in der Frühphase der Infektion relevant zu sein und wirkt möglicherweise durch eine erhöhte Konzentration an der Zelloberfläche in Assoziation mit dortigen Proteoglykanen. Des Weiteren führt IL-26 zu einer vermehrten Expression antiviraler Gene wie IFN- β , MxA, 2'5'-OAS und ISG15. Zur Identifizierung des Wirkmechanismus sind weitergehende Untersuchungen erforderlich. IL-26 könnte jedoch ein potentielles Ziel für die Entwicklung medikamentöser Therapie-strategien viraler Infektionen oder Autoimmunerkrankungen darstellen.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
2'5'-OAS	2'5'-Oligoadenylat-Synthetase
ACV	Aciclovir
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DE	<i>Delayed early</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Enzymimmuntest
FKS	Fötale Rinderserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCV	Ganciclovir
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
Gln	Glutamin
GVHD	<i>Graft-versus-host disease</i>
hCMV	humanes Cytomegalovirus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HFF	Primäre Vorhautfibroblasten
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
IE	<i>Immediate early</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-10R	Interleukin-10-Rezeptor
IL-22BP	IL-22-Bindeprotein
IRF	<i>IFN-regulatory factor</i>
ISG15	<i>Interferon-stimulated gene 15</i>
JAK1	Janus-Kinase 1
L	<i>Late</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>

Abkürzung	Bezeichnung
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
M-TBS	Magermilch- <i>Tris-buffered saline</i>
MxA	<i>Myxovirus resistance gene A</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>Plaque-forming unit</i> (Plaque-bildende Einheit)
p.i.	post infectionem
PKR	Proteinkinase R
pp	phosphoryliertes Protein
pSTAT	phospho-STAT
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Reverse Transkriptase
S100A	<i>S100-calcium-binding protein A</i>
SDS-PAGE	Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SEVI	<i>Semen-derived enhancer of virus infection</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th	T-Helferzellen
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tyk2	Tyrosinkinase 2
WST-1	<i>Water-soluble tetrazolium 1</i>

8 Literaturverzeichnis

- Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES (2004) Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* 78:10995-11006.
- Adler SP (1988) Cytomegalovirus transmission among children in day care, their mothers and caretakers. *Pediatr Infect Dis J* 7:279-285.
- Aggarwal S, Xie MH, Maruoka M, Foster J, Gurney AL (2001) Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J Interferon Cytokine Res* 21:1047-1053.
- Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW, Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ (1999) SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 98:597-608.
- Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y (2005) Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 129:969-984.
- Arthur JL, Scarpini CG, Connor V, Lachmann RH, Tolkovsky AM, Efstathiou S (2001) Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *J Virol* 75:3885-3895.
- Asanuma H, Numazaki K, Nagata N, Hotsubo T, Horino K, Chiba S (1996) Role of milk whey in the transmission of human cytomegalovirus infection by breast milk. *Microbiol Immunol* 40:201-204.
- Bazan JF (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6934-6938.
- Blumberg H, Conklin D, Xu WF, Grossmann A, Brender T, Carollo S, Eagan M, Foster D, Haldeman BA, Hammond A, Haugen H, Jelinek L, Kelly JD, Madden K, Maurer MF, Parrish-Novak J, Prunkard D, Sexson S, Sprecher C, Waggle K, West J, Whitmore TE, Yao L, Kuechle MK, Dale BA, Chandrasekhar YA (2001) Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 104:9-19.
- Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F (2005) IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 174:3695-3702.
- Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ (2001) Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 344:1366-1371.
- Boyle KA, Compton T (1998) Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol* 72:1826-1833.
- Braum O (2013) Funktionen des humanen Interleukin-26 in der Zellbiologie und für die Virusinfektion. Naturwissenschaftliche Promotionsarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Braum O, Klages M, Fickenscher H (2013) The cationic cytokine IL-26 differentially modulates virus infection in culture. *PLOS One* 8: e70281.
- Brierley MM, Fish EN (2002) Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *J Interferon Cytokine Res* 22:835-845.
- Britt W (2006a) Maturation and egress. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 308-320.

- Britt W (2006b) HCMV: pathogenesis and disease consequences. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.): Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge Press; 719-745.
- Britt WJ, Boppana S (2004) Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol* 65:395-402.
- Bronke C, Palmer NM, Jansen CA, Westerlaken GH, Polstra AM, Reiss P, Bakker M, Miedema F, Tesselaar K, van Baarle D (2005) Dynamics of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells in HIV-1-infected individuals progressing to AIDS with CMV end-organ disease. *J Infect Dis* 191:873-880.
- Broome AM, Ryan D, Eckert RL (2003) S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem* 51:675-685.
- Browne EP, Shenk T (2003) Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11439-11444.
- Cai G, Kastelein RA, Hunter CA (1999) IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur J Immunol* 29:2658-2665.
- Cannon MJ, Davis KF (2005) Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Public Health* 5:70.
- Cao XX, Mohuidin I, Chada S, Mhashilkar AM, Ozvaran MK, McConkey DJ, Miller SD, Daniel JC, Smythe WR (2002) Adenoviral transfer of mda-7 leads to BAX up-regulation and apoptosis in mesothelioma cells, and is abrogated by over-expression of BCL-XL. *Mol Med* 8:869-876.
- Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, Ekmekcioglu S, Mhashilkar AM, Yang XH, Retter MW, Hill P, Chada S, Grimm EA (2002) The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol* 168:6041-6046.
- Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, Doherty JM, Mills JC, Colonna M (2009) A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457:722-725.
- Chandler SH, Alexander ER, Holmes KK (1985) Epidemiology of cytomegaloviral infection in a heterogeneous population of pregnant women. *J Infect Dis* 152:249-256.
- Chang C, Magracheva E, Kozlov S, Fong S, Tobin G, Kotenko S, Wlodawer A, Zdanov A (2003) Crystal structure of interleukin-19 defines a new subfamily of helical cytokines. *J Biol Chem* 278:3308-3313.
- Cheung TW, Teich SA (1999) Cytomegalovirus infection in patients with HIV infection. *Mt Sinai J Med* 66:113-124.
- Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, Cella M, Lande R, Uzé G (2004) Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 34:796-805.
- Compton T, Fiere A (2006) Early events in human cytomegalovirus infection. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge Press; 229-238.
- Coonrod D, Collier AC, Ashley R, DeRouen T, Corey L (1998) Association between cytomegalovirus seroconversion and upper genital tract infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a prospective study. *J Infect Dis* 177:1188-1193.
- Corvaisier M, Delneste Y, Jeanvoine H, Preisser L, Blanchard S, Garo E, Hoppe E, Barré B, Audran M, Bouvard B, Saint-André JP, Jeannin P (2012) IL-26 is overexpressed in rheu-

matoid arthritis and induces proinflammatory cytokine production and Th17 cell generation. *PLoS Biol* 10:e1001395.

Crack LR, Jones L, Malavige GN, Patel V, Ogg GS (2012) Human antimicrobial peptides LL-37 and human β -defensin-2 reduce viral replication in keratinocytes infected with varicella zoster virus. *Clin Exp Dermatol* 37:534-543.

Cunningham CC, Chada S, Merritt JA, Tong A, Senzer N, Zhang Y, Mhashilkar A, Parker K, Vukelja S, Richards D, Hood J, Coffee K, Nemunaitis J (2005) Clinical and local biological effects of an intratumoral injection of mda-7 (IL24; INGN 241) in patients with advanced carcinoma: a phase I study. *Mol Ther* 11:149-159.

Dalod M, Salazar-Mather TP, Malmgaard L, Lewis C, Asselin-Paturel C, Brière F, Trinchieri G, Biron CA (2002) Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 195:517-528.

Dalod M, Hamilton T, Salomon R, Salazar-Mather TP, Henry SC, Hamilton JD, Biron CA (2003) Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* 197:885-898.

Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, De Toni EN, Göke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ, Brand S (2009) The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58:1207-1217.

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178:1041-1048.

Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML (2002) Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem* 97: 159-172.

Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML (2004) Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J* 86:1234-1242.

D'Cruz LM, Klein L (2005) Development and function of agonist-induced CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6:1152-1159.

de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA (1998) Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* 39:141-162.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991a) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209-1220.

de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE (1991b) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174:915-924.

Deayton JR, Sabin CA, Britt WB, Jones IM, Wilson P, Johnson MA, Griffiths PD, Emery VC (2002) Rapid reconstitution of humoral immunity against cytomegalovirus but not HIV following highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 16:2129-2135.

Digel M, Sinzger C (2006) Determinants of endothelial cell tropism of human cytomegalovirus. In: Reddehase MJ, (Hrsg.). *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control*. Norfolk, United Kingdom: Caister Scientific Press; 445-464.

Ding L, Shevach EM (1992) IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 148:3133-3139.

- Ding Y, Chen D, Tarcsafalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS (2003) Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. *J Immunol* 170:1383-1391.
- Döhner K, Sodeik B (2004) The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 285:67-108.
- Donnelly RP, Dickensheets H, Finbloom DS (1999) The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* 19:563-573.
- Dumoutier L, Louahed J, Renauld JC (2000a) Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 164:1814-1819.
- Dumoutier L, Van Roost E, Ameye G, Michaux L, Renauld JC (2000b) IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes. *Genes Immun* 1:488-494.
- Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renauld JC (2000c) Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as a hepatocyte-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10144-10149.
- Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kotenko SV, Renauld JC (2001a) Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol* 167:3545-3549.
- Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renauld JC (2001b) Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol* 166:7090-7095.
- Dworsky M, Yow M, Stagno S, Pass RF, Alford C (1983) Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* 72:295-299.
- Eddleston M, Peacock S, Juniper M, Warrell DA (1997) Severe cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis* 24:52-56.
- Ellerhorst JA, Prieto VG, Ekmekcioglu S, Broemeling L, Yekell S, Chada S, Grimm EA (2002) Loss of MDA-7 expression with progression of melanoma. *J Clin Oncol* 20:1069-1074.
- Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI (1993) Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 151:2390-2398.
- Falk CS, Mach M, Schendel DJ, Weiss EH, Hilgert I, Hahn G (2002) NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation. *J Immunol* 169:3257-3266.
- Faucher JF, Abraham B, Segondy M, Jonquet O, Reynes J, Janbon F (1998) Acquired cytomegalovirus infections in immunocompetent adults: 116 cases. *Presse Med* 27:1774-1779.
- Fickenscher H, Hör S, Küpers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H (2002) The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 23:89-96.
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME (2005) National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 945-956.
- Finbloom DS, Winestock KD (1995) IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 155:1079-1090.

- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-2095.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815-3822.
- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY (2005) A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142-1151.
- Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA (1992) The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 326:663-667.
- Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Peat JD, Vazquez N, Pestka S, Donnelly RP, Kotenko SV (2000) Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). *Genes Immun* 1:442-450.
- Gerna G, Baldanti F, Revello MG (2004) Pathogenesis of human cytomegalovirus infection and cellular targets. *Hum Immunol* 65:381-386.
- Gerna G, Percivalle E, Lilleri D, Lozza L, Fornara C, Hahn G, Baldanti F, Revello MG (2005) Dendritic-cell infection by human cytomegalovirus is restricted to strains carrying functional UL131-128 genes and mediates efficient viral antigen presentation to CD8+ T cells. *J Gen Virol* 86:275-284.
- Gewurz BE, Gaudet R, Tortorella D, Wang EW, Ploegh HL (2001) Virus subversion of immunity: a structural perspective. *Curr Opin Immunol* 13:442-450.
- Gillis S, Baker PE, Ruscetti FW, Smith KA (1978) Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med* 148:1093-1098.
- Gillis S, Smith KA (1977) Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* 268:154-156.
- Goris A, Marrosu MG, Vandebroek K (2001) Novel polymorphisms in the IL-10 related AK155 gene (chromosome 12q15). *Genes Immun* 2:284-286.
- Gruenberg BH, Schoenemeyer A, Weiss B, Toschi L, Kunz S, Wolk K, Asadullah K, Sabat R (2001) A novel, soluble homologue of the human IL-10 receptor with preferential expression in placenta. *Genes Immun* 2:329-334.
- Haller OA, Mertens T (Hrsg.) (1999). Zytomegalievirus (CMV). In: Diagnostik und Therapie von Viruserkrankheiten. Leitlinien der Gesellschaft für Virologie. München/Jena: Urban & Fischer, pp. 235.
- Hamprecht K, Jahn G (2007) Humanes Cytomegalovirus und kongenitale Infektion. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 50:1379-1392.
- Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, Lehrer RI, Herold BC (2006) Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol* 177:8658-8666.
- Heineman TC, Schleiss M, Bernstein DI, Spaete RR, Yan L, Duke G, Prichard M, Wang Z, Yan Q, Sharp MA, Klein N, Arvin AM, Kemble G (2006) A phase 1 study of 4 live, recombinant human cytomegalovirus Towne/Toledo chimeric vaccines. *J Infect Dis* 193:1350-1360.
- Hertel L, Lacaille VG, Strobl H, Mellins ED, Mocarski ES (2003) Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *J Virol* 77:7563-7574.
- Hertel L, Mocarski ES (2004) Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of pseudomitosis independent of US28 function. *J Virol* 78:11988-12011.

- Holland DB, Bojar RA, Farrar MD, Holland KT (2009) Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 290:149-155.
- Hör S, Pirzer H, Dumoutier L, Bauer F, Wittmann S, Sticht H, Renauld JC, de Waal Malefyt R, Fickenscher H (2004) The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J Biol Chem* 279:33343-33351.
- Hosoi T, Wada S, Suzuki S, Okuma Y, Akira S, Matsuda T, Nomura Y (2004) Bacterial endotoxin induces IL-20 expression in the glial cells. *Brain Res Mol Brain Res* 130:23-29.
- Hotsubo T, Nagata N, Shimada M, Yoshida K, Fujinaga K, Chiba S (1994) Detection of human cytomegalovirus DNA in breast milk by means of polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol* 38:809-811.
- Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW (1990) Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 250:830-832.
- Hsu YH, Li HH, Hsieh MY, Liu MF, Huang KY, Chin LS, Chen PC, Cheng HH, Chang MS (2006) Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 54:2722-2733.
- Hughes T, Becknell B, McClory S, Briercheck E, Freud AG, Zhang X, Mao H, Nuovo G, Yu J, Caligiuri MA (2009) Stage 3 immature human natural killer cells found in secondary lymphoid tissue constitutively and selectively express the TH 17 cytokine interleukin-22. *Blood* 113:4008-4010.
- Hunt DW, Boivin WA, Fairley LA, Jovanovic MM, King DE, Salmon RA, Utting OB (2006) Ultraviolet B light stimulates interleukin-20 expression by human epithelial keratinocytes. *Photochem Photobiol* 82:1292-1300.
- Hutto C, Little EA, Ricks R, Lee JD, Pass RF (1986) Isolation of cytomegalovirus from toys and hands in a day care center. *J Infect Dis* 154:527-530.
- Igawa D, Sakai M, Savan R (2006) An unexpected discovery of two interferon gamma-like genes along with interleukin (IL)-22 and -26 from teleost: IL-22 and -26 genes have been described for the first time outside mammals. *Mol Immunol* 43:999-1009.
- Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y (2005) Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 52:1037-1046.
- Istas AS, Demmler GJ, Dobbins JG, Stewart JA (1995) Surveillance for congenital cytomegalovirus disease: a report from the National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry. *Clin Infect Dis* 20:665-670.
- Jenkins C, Abendroth A, Slobedman B (2004) A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J Virol* 78:1440-1447.
- Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, Goldstein NI, Fisher PB (1995) Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 11:2477-2486.
- Jiang H, Su ZZ, Lin JJ, Goldstein NI, Young CS, Fisher PB (1996) The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9160-9165.
- Jim WT, Shu CH, Chiu NC, Kao HA, Hung HY, Chang JH, Peng CC, Hsieh WS, Liu KC, Huang FY (2004) Transmission of cytomegalovirus from mothers to preterm infants by breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 23:848-851.

- Jones BC, Logsdon NJ, Walter MR (2008) Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Structure* 16:1333-1344.
- Jordan MC, Rousseau W, Stewart JA, Noble GR, Chin TD (1973) Spontaneous cytomegalovirus mononucleosis. Clinical and laboratory observations in nine cases. *Ann Intern Med* 79:153-160.
- Josephson K, Logsdon NJ, Walter MR (2001) Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site. *Immunity* 15:35-46.
- Kattenhorn LM, Mills R, Wagner M, Lomsadze A, Makeev V, Borodovsky M, Ploegh HL, Kessler BM (2004) Identification of proteins associated with murine cytomegalovirus virions. *J Virol* 78:11187-11197.
- Keene JA, Forman J (1982) Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 155:768-782.
- Kim WR, Badley AD, Wiesner RH, Porayko MK, Seaberg EC, Keating MR, Evans RW, Dickson ER, Krom RA, Paya CV (2000) The economic impact of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Transplantation* 69:357-361.
- Klebb G, Autenrieth IB, Haber H, Gillert E, Sadlack B, Smith KA, Horak I (1996) Interleukin-2 is indispensable for development of immunological self-tolerance. *Clin Immunol Immunopathol* 81:282-286.
- Klemola E, Von Essen R, Henle G, Henle W (1970) Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J Infect Dis* 121:608-614.
- Knappe A, Hör S, Wittmann S, Fickenscher H (2000) Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J Virol* 74:3881-3887.
- Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S (1997) Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J* 16:5894-5903.
- Kotenko SV, Sacconi S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S (2000) Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1695-1700.
- Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S (2001a) Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* 276:2725-2732.
- Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S (2001b) Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol* 166:7096-7103.
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP (2003) IFN-lambda mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4:69-77.
- Krech U (1973) Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ* 49:103-106.
- Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke WD, Volk HD, Sterry W, Asadullah K, Sabat R (2006) Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp Dermatol* 15:991-1004.
- Laing RB, Dykhuizen RS, Smith CC, Molyneaux PJ (1997) Parenteral ganciclovir treatment of acute CMV infection in the immunocompetent host. *Infection* 25:44-46.

- Lamberson HV, Dock NL (1992) Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion* 32:196-198.
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ (2007) Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26:371-381.
- Lebedeva IV, Su ZZ, Chang Y, Kitada S, Reed JC, Fisher PB (2002) The cancer growth suppressing gene mda-7 induces apoptosis selectively in human melanoma cells. *Oncogene* 21:708-718.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA (2006) Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203:2271-2279.
- Liao YC, Liang WG, Chen FW, Hsu JH, Yang JJ, Chang MS (2002) IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol* 169:4288-4297.
- Liao SC, Cheng YC, Wang YC, Wang CW, Yang SM, Yu CK, Shieh CC, Cheng KC, Lee MF, Chiang SR, Shieh JM, Chang MS (2004) IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients. *J Immunol* 173:6712-6718.
- Liu F, Zhou ZH (2006) Comparative virion structure of human herpesviruses. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 27-43.
- Liu Y, Wei SH, Ho AS, de Waal Malefyt R, Moore KW (1994) Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol* 152:1821-1829.
- Liu Y, de Waal Malefyt R, Briere F, Parham C, Bridon JM, Banchereau J, Moore KW, Xu J (1997) The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol* 158:604-613.
- Ljungman P, Griffiths P, Paya C (2002) Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 34:1094-1097.
- Lockridge KM, Zhou SS, Kravitz RH, Johnson JL, Sawai ET, Blewett EL, Barry PA (2000) Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein. *Virology* 268:272-280.
- Lubberts E (2010) Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol* 32:43-53.
- Lutfalla G, Gardiner K, Uzé G (1993) A new member of the cytokine receptor gene family maps on chromosome 21 at less than 35 kb from IFNAR. *Genomics* 16:366-373.
- Macatonia SE, Doherty TM, Knight SC, O'Garra A (1993) Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 150:3755-3765.
- Mandell GL et al., (Hrsg.) (1995). *Principles and practice of infectious diseases*. Fourth Edition. Churchill Livingstone, New York.
- Manel N, Unutmaz D, Littman DR (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat Immunol* 9:641-649.
- Marschall M, Freitag M, Weiler S, Sorg G, Stamminger T (2000) Recombinant green fluorescent protein-expressing human cytomegalovirus as a tool for screening antiviral agents. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1588-1597.
- McCormick AL, Meiering CD, Smith GB, Mocarski ES (2005) Mitochondrial cell death suppressors carried by human and murine cytomegalovirus confer resistance to proteasome inhibitor-induced apoptosis. *J Virol* 79:12205-12217.

- McCormick AL, Mocarski ES (2006) Viral modulation of the host response to infection. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 321-332.
- McMahon TP, Anders DG (2002) Interactions between human cytomegalovirus helicase-primase proteins. *Virus Res* 86:39-52.
- Meier J, Lienicke U, Tschirch E, Krüger DH, Wauer RR, Prösch S (2005) Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants. *J Clin Microbiol* 43:1318-1324.
- Mettenleiter TC (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* 106:167-180.
- Mhashilkar AM, Schrock RD, Hindi M, Liao J, Sieger K, Kourouma F, Zou-Yang XH, Onishi E, Takh O, Vedvick TS, Fanger G, Stewart L, Watson GJ, Snary D, Fisher PB, Saeki T, Roth JA, Ramesh R, Chada S (2001) Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7): a novel anti-tumor gene for cancer gene therapy. *Mol Med* 7:271-282.
- Miot C, Beaumont E, Duluc D, Le Guillou-Guillemette H, Preisser L, Garo E, Blanchard S, Hubert Fouchard I, Créminon C, Lamourette P, Fremaux I, Calès P, Lunel-Fabiani F, Boursier J, Braum O, Fickenscher H, Roingard P, Delneste Y, Jeannin P (2014) IL-26 is overexpressed in chronically HCV-infected patients and enhances TRAIL-mediated cytotoxicity and interferon production by human NK cells. *Gut* gutjnl-2013-306604.
- Mocarski ES (1994) Cytomegaloviruses. In: Webster RG and Granoff A (Hrsg.): *Encyclopedia of Virology*. Volume 1. London: Academic Press, pp. 292.
- Mocarski ES Jr, Courcelle CT (2001) Cytomegaloviruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al., (Hrsg.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2629-2673.
- Mocarski ES Jr (2004) Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol* 6:707-717.
- Mocarski ES (2006a) Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 44-58.
- Mocarski ES (2006b) Viral genes and their functions. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 202-228.
- Mocarski ES Jr, Hahn G, White KL, et al., (2006) Myeloid cell recruitment and function in pathogenesis and latency. In: Reddehase MJ, (Hrsg.). *Cytomegaloviruses: Pathogenesis, Molecular Biology, and Infection Control*. Norfolk, United Kingdom: Caister Scientific Press; 465-482.
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
- Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193:1007-1008.
- Münch J, Rücker E, Ständker L, Adermann K, Goffinet C, Schindler M, Wildum S, Chinnadurai R, Rajan D, Specht A, Giménez-Gallego G, Sánchez PC, Fowler DM, Koulov A, Kelly JW, Mothes W, Grivel JC, Margolis L, Keppler OT, Forssmann WG, Kirchhoff F (2007) Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection. *Cell* 131:1059-1071.
- Murph JR, Bale JF Jr, Murray JC, Stinski MF, Perlman S (1986) Cytomegalovirus transmission in a Midwest day care center: possible relationship to child care practices. *J Pediatr* 109:35-39.

- Nagalakshmi ML, Murphy E, McClanahan T, de Waal Malefyt R (2004a) Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol* 4:577-592.
- Nagalakshmi ML, Rascole A, Zurawski S, Menon S, de Waal Malefyt R (2004b) Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 4:679-691.
- Nagem RA, Colau D, Dumoutier L, Renauld JC, Ogata C, Polikarpov I (2002) Crystal structure of recombinant human interleukin-22. *Structure* 10:1051-1062.
- Naka T, Tsutsui H, Fujimoto M, Kawazoe Y, Kohzaki H, Morita Y, Nakagawa R, Narazaki M, Adachi K, Yoshimoto T, Nakanishi K, Kishimoto T (2001) SOCS-1/SSI-1-deficient NKT cells participate in severe hepatitis through dysregulated cross-talk inhibition of IFN-gamma and IL-4 signaling in vivo. *Immunity* 14:535-545.
- Nguyen H, Hiscott J, Pitha PM (1997) The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:293-312.
- Niemand C, Nimmegern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, Heinrich PC, Müller-Newen G (2003) Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 170:3263-3272.
- Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best AM; Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group (2005) Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 353:1350-1362.
- Noda S, Aguirre SA, Bitmansour A, Brown JM, Sparer TE, Huang J, Mocarski ES (2006) Cytomegalovirus MCK-2 controls mobilization and recruitment of myeloid progenitor cells to facilitate dissemination. *Blood* 107:30-38.
- Ohnuma K, Hatano R, Aune TM, Otsuka H, Iwata S, Dang NH, Yamada T, Morimoto C (2015) Regulation of pulmonary graft-versus-host disease by IL-26+CD26+CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 194:3697-3712.
- Pannuti CS, Vilas Boas LS, Angelo MJ, Amato Neto V, Levi GC, de Mendonca JS, de Godoy CV (1985) Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults: differences in clinical presentation. *Scand J Infect Dis* 17:153-156.
- Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Pénit C (1998) Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 10:371-378.
- Parrish-Novak J, Xu W, Brender T, Yao L, Jones C, West J, Brandt C, Jelinek L, Madden K, McKernan PA, Foster DC, Jaspers S, Chandrasekher YA (2002) Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *J Biol Chem* 277:47517-47523.
- Pass RF, Hutto SC, Reynolds DW, Polhill RB (1984) Increased frequency of cytomegalovirus infection in children in group day care. *Pediatrics* 74:121-126.
- Pass RF (2001) Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al., (Hrsg.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2675-2705.
- Pass RF, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Stagno S (2006) Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *J Clin Virol* 35:216-220.
- Paulus C, Krauss S, Nevels M (2006) A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3840-3845.
- Peck A, Mellins ED (2009) Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 132:295-304.

- Péguet-Navarro J, Moulon C, Caux C, Dalbiez-Gauthier C, Banchereau J, Schmitt D (1994) Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol* 24:884-891.
- Pène J, Chevalier S, Preisser L, Vénéreau E, Guilleux MH, Ghannam S, Molès JP, Danger Y, Ravon E, Lesaux S, Yssel H, Gascan H (2008) Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol* 180:7423-7430.
- Penfold ME, Mocarski ES (1997) Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. *Virology* 239:46-61.
- Pereira LH, Embil JA, Haase DA, Manley KM (1990) Cytomegalovirus infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: association with clinical symptoms and other sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol* 131:683-692.
- Petrik J (2006) Diagnostic applications of microarrays. *Transfus Med* 16:233-247.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36.
- Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U (2005) Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant* 5:218-227.
- Prichard MN, Jairath S, Penfold ME, St Jeor S, Bohlman MC, Pari GS (1998) Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. *J Virol* 72:6997-7004.
- Qi ZT, Nie P (2008) Comparative study and expression analysis of the interferon gamma gene locus cytokines in *Xenopus tropicalis*. *Immunogenetics* 60:699-710.
- Quartier P, Allantaz F, Cimaz R, Pillet P, Messiaen C, Bardin C, Bossuyt X, Boutten A, Bienvenu J, Duquesne A, Richer O, Chaussabel D, Mogenet A, Banchereau J, Treluyer JM, Landais P, Pascual V (2011) A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with the interleukin-1 receptor antagonist anakinra in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis (ANAJIS trial). *Ann Rheum Dis* 70:747-754.
- Ramesh R, Mhashilkar AM, Tanaka F, Saito Y, Branch CD, Sieger K, Mumm JB, Stewart AL, Boquoi A, Dumoutier L, Grimm EA, Renauld JC, Kotenko S, Chada S (2003) Melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin (IL)-24 is a novel ligand that regulates angiogenesis via the IL-22 receptor. *Cancer Res* 63:5105-5113.
- Reeves MB, Lehner PJ, Sissons JG, Sinclair JH (2005a) An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. *J Gen Virol* 86:2949-2954.
- Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, Sissons JG, Sinclair JH (2005b) Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4140-4145.
- Reimer K, Meisel H (1996) Humanes Zytomegalievirus. In: T. Porstmann (Hrsg.): *Virusdiagnostik. Diagnostische Bibliothek, Band 1*. Berlin/Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, pp. 258.
- Reynolds DW, Stagno S, Hosty TS, Tiller M, Alford CA Jr (1973) Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med* 289:1-5.
- Roan NR, Münch J, Arhel N, Mothes W, Neidleman J, Kobayashi A, Smith-McCune K, Kirchhoff F, Greene WC (2009) The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83:73-80.

Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J (1992) Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1890-1893.

Ryckman BJ, Jarvis MA, Drummond DD, Nelson JA, Johnson DC (2006) Human cytomegalovirus entry into epithelial and endothelial cells depends on genes UL128 to UL150 and occurs by endocytosis and low-pH fusion. *J Virol* 80:710-722.

Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J (2010) Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:331-344.

Saeki T, Mhashilkar A, Chada S, Branch C, Roth JA, Ramesh R (2000) Tumor-suppressive effects by adenovirus-mediated mda-7 gene transfer in non-small cell lung cancer cell in vitro. *Gene Ther* 7:2051-2057.

Saeki T, Mhashilkar A, Swanson X, Zou-Yang XH, Sieger K, Kawabe S, Branch CD, Zumbstein L, Meyn RE, Roth JA, Chada S, Ramesh R (2002) Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression in vivo. *Oncogene* 21:4558-4566.

Salazar-Mather TP, Hamilton TA, Biron CA (2000) A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest* 105:985-993.

Salazar-Mather TP, Lewis CA, Biron CA (2002) Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1 α delivery to the liver. *J Clin Invest* 110:321-330.

Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, Valerie K, Dent P, Fisher PB (2002) mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10054-10059.

Sauane M, Gopalkrishnan RV, Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Dent P, Pestka S, Fisher PB (2003) MDA-7/IL-24: novel cancer growth suppressing and apoptosis inducing cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:35-51.

Savan R, Ravichandran S, Collins JR, Sakai M, Young HA (2009) Structural conservation of interferon gamma among vertebrates. *Cytokine Growth Factor Rev* 20:115-124.

Schaefer G, Venkataraman C, Schindler U (2001) Cutting edge: FISP (IL-4-induced secreted protein), a novel cytokine-like molecule secreted by Th2 cells. *J Immunol* 166:5859-5863.

Schoenmakers EF, Geurts JM, Kools PF, Mols R, Huysmans C, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ (1995) A 6-Mb yeast artificial chromosome contig and long-range physical map encompassing the region on chromosome 12q15 frequently rearranged in a variety of benign solid tumors. *Genomics* 29:665-678.

Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW (2010) Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376:1094-1108.

Seeff LB (2009) The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). *Liver Int* 29 Suppl 1:89-99.

Sheikh F, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shah NK, Smirnov SV, Anantha S, Dickensheets H, Dumoutier L, Renauld JC, Zdanov A, Donnelly RP, Kotenko SV (2004) Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2. *J Immunol* 172:2006-2010.

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrand C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4:63-68.

- Silverberg MS, Cho JH, Rioux JD, McGovern DP, Wu J, Annese V, Achkar JP, Goyette P, Scott R, Xu W, Barmada MM, Klei L, Daly MJ, Abraham C, Bayless TM, Bossa F, Griffiths AM, Ippoliti AF, Lahaie RG, Latiano A, Paré P, Proctor DD, Regueiro MD, Steinhart AH, Targan SR, Schumm LP, Kistner EO, Lee AT, Gregersen PK, Rotter JI, Brant SR, Taylor KD, Roeder K, Duerr RH (2010) Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome-wide association study. *Nat Genet* 41:216-220.
- Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS (2001) A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7829-7834.
- Smith GB, Mocarski ES (2005) Contribution of GADD45 family members to cell death suppression by cellular Bcl-xL and cytomegalovirus vMIA. *J Virol* 79:14923-14932.
- Smith KA (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-1176.
- Snydman DR (2001) Historical overview of the use of cytomegalovirus hyperimmune globulin in organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 3 Suppl 2:6-13.
- Sohn YM, Oh MK, Balcarek KB, Cloud GA, Pass RF (1991) Cytomegalovirus infection in sexually active adolescents. *J Infect Dis* 163:460-463.
- Soriano V, Peters MG, Zeuzem S (2009) New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 48:313-320.
- Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, Lin G, Tsang M, Penfold ME, Schall TJ (2002) Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 76:1285-1292.
- Staeheli P (1990) Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv Virus Res* 38:147-200.
- Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Alford CA Jr (1982) Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. *Clin Obstet Gynecol* 25:563-576.
- Stagno S, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA (1986) Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 256:1904-1908.
- Staras SA, Flanders WD, Dollard SC, Pass RF, McGowan JE Jr, Cannon MJ (2008) Influence of sexual activity on cytomegalovirus seroprevalence in the United States, 1988-1994. *Sex Transm Dis* 35:472-479.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264.
- Stegmann KA, Björkström NK, Veber H, Ciesek S, Riese P, Wiegand J, Hadem J, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Wang C, Schlaphoff V, Fytilli P, Cornberg M, Manns MP, Geffers R, Pietschmann T, Guzmán CA, Ljunggren HG, Wedemeyer H (2010) Interferon-alpha-induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 138:1885-1897.
- Stinski MF, Meier J (2006) Immediate early viral gene regulation and function. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge Press; 239-261.
- Stratton K, Durch J, Lawrence R (2001) *Vaccines for the 21st Century: A tool for decision making*. Washington, DC: National Academy Press; 165-172.
- Suzuki H, Zhou YW, Kato M, Mak TW, Nakashima I (1999) Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med* 190:1561-1572.
- Tamarit A, Alberola J, Mira JV, Tornero C, Galindo MJ, Navarro D (2004) Assessment of human cytomegalovirus specific T cell immunity in human immunodeficiency virus infected pa-

tients in different disease stages following HAART and in long-term non-progressors. *J Med Virol* 74:382-389.

Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick DM (1991) Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J Exp Med* 173:507-510.

Tohyama M, Hanakawa Y, Shirakata Y, Dai X, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Okazaki H, Sayama K, Hashimoto K (2009) IL-17 and IL-22 mediate IL-20 subfamily cytokine production in cultured keratinocytes via increased IL-22 receptor expression. *Eur J Immunol* 39:2779-2788.

Tong AW, Nemunaitis J, Su D, Zhang Y, Cunningham C, Senzer N, Netto G, Rich D, Mhashilkar A, Parker K, Coffee K, Ramesh R, Ekmekcioglu S, Grimm EA, van Wart Hood J, Merritt J, Chada S (2005) Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 (mda-7/IL24): biologic outcome in advanced cancer patients. *Mol Ther* 11:160-172.

Trincado DE, Rawlinson WD (2001) Congenital and perinatal infections with cytomegalovirus. *J Paediatr Child Health* 37:187-192.

Tritsaris K, Myren M, Ditlev SB, Hübschmann MV, van der Blom I, Hansen AJ, Olsen UB, Cao R, Zhang J, Jia T, Wahlberg E, Dissing S, Cao Y (2007) IL-20 is an arteriogenic cytokine that remodels collateral networks and improves functions of ischemic hind limbs. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15364-15369.

Tu W, Potena L, Stepick-Biek P, Liu L, Dionis KY, Luikart H, Fearon WF, Holmes TH, Chin C, Cooke JP, Valantine HA, Mocarski ES, Lewis DB (2006) T-cell immunity to subclinical cytomegalovirus infection reduces cardiac allograft disease. *Circulation* 114:1608-1615.

Vandenbroeck K, Cunningham S, Goris A, Alloza I, Heggarty S, Graham C, Bell A, Rooney M (2003) Polymorphisms in the interferon-gamma/interleukin-26 gene region contribute to sex bias in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48:2773-2778.

Varnum SM, Strelow DN, Monroe ME, Smith P, Auberry KJ, Pasa-Tolic L, Wang D, Camp DG 2nd, Rodland K, Wiley S, Britt W, Shenk T, Smith RD, Nelson JA (2004) Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 78:10960-10966.

Vlotides G, Sørensen AS, Kopp F, Zitzmann K, Cengic N, Brand S, Zachoval R, Auernhammer CJ (2004) SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem Biophys Res Commun* 320:1007-1014.

Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, Speer CP (1998) Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatr Infect Dis J* 17:53-58.

Walter MR, Nagabhushan TL (1995) Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon gamma-like fold. *Biochemistry* 34:12118-12125.

Wang M, Tan Z, Zhang R, Kottenko SV, Liang P (2002) Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *J Biol Chem* 277:7341-7347.

Weber-Nordt RM, Riley JK, Greenlund AC, Moore KW, Darnell JE, Schreiber RD (1996) Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 271:27954-27961.

Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt RM (1996) IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes. *FEBS Lett* 394:365-370.

Welte K, Mertelsmann R (1985) Human interleukin 2: biochemistry, physiology, and possible pathogenetic role in immunodeficiency syndromes. *Cancer Invest* 3:35-49.

- White EA, Spector DH (2006) Early viral gene regulation and function. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge Press; 262-291.
- Wills MR, Carmichael AJ, Sinclair JH (2006) HCMV: immunobiology and host response. In: Arvin AM, Mocarski ES, Moore P, et al., (Hrsg.). Human Herpesviruses: Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge Press; 760-774.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron JC, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950-957.
- Wolf M, Schimpl A, Hünig T (2001) Control of T cell hyperactivation in IL-2-deficient mice by CD4(+)CD25(-) and CD4(+)CD25(+) T cells: evidence for two distinct regulatory mechanisms. *Eur J Immunol* 31:1637-1645.
- Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R (2002) Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 168:5397-5402.
- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21:241-254.
- Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 36:1309-1323.
- Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R (2007) IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 178:5973-5981.
- Wolk K, Witte K, Witte E, Proesch S, Schulze-Tanzil G, Nasilowska K, Thilo J, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Sabat R (2008) Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol* 83:1181-1193.
- Wolk K, Witte E, Warszawska K, Schulze-Tanzil G, Witte K, Philipp S, Kunz S, Döcke WD, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R (2009) The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol* 39:3570-3581.
- Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL (2000) Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 275:31335-31339.
- Xu T, Logsdon NJ, Walter MR (2005) Structure of insect-cell-derived IL-22. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61:942-950.
- Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, Kindsvogel W, Jaspers S, Chen Z, Dillon SR, Gao Z, Gilbert T, Madden K, Schlutsmeyer S, Yao L, Whitmore TE, Chandrasekhar Y, Grant FJ, Maurer M, Jelinek L, Storey H, Brender T, Hammond A, Topouzis S, Clegg CH, Foster DC (2001) A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9511-9516.
- Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A (1999) The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 18:1309-1320.
- Yoon SI, Logsdon NJ, Sheikh F, Donnelly RP, Walter MR (2006) Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J Biol Chem* 281:35088-35096.

Yoon SI, Jones BC, Logsdon NJ, Harris BD, Deshpande A, Radaeva S, Halloran BA, Gao B, Walter MR (2010) Structure and mechanism of receptor sharing by the IL-10R2 common chain. *Structure* 18:638-648.

Yu D, Silva MC, Shenk T (2003) Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12396-12401.

Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A (1995) Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure* 3:591-601.

Zdanov A (2010) Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:325-330.

Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W (2007) Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445:648-651.

9 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Helmut Fickenscher für die gute Betreuung und dafür, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können. Für mich war dies eine ganz besondere Erfahrung abseits des medizinischen Alltags. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass er auch in schwierigen Phasen weiter an die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt und mich dazu motiviert hat.

Mein besonderer Dank gebührt auch Dr. Oliver Braum, der mich als Betreuer in meiner Arbeit tatkräftig unterstützt und mir immer mit seinem Rat zur Seite gestanden hat. Diese Arbeit wäre ohne seine technische Anleitung und seine Beratung in allen Fragen des Laboralltags wohl nicht möglich gewesen.

Für ihre technische Unterstützung möchte ich außerdem bei Gabi Prühs-Havemann danken.

Bei Tanja Spieckermann, Linda Bremer, Anne Brunnemann, Gregor Maschkowitz und Björn Brändl möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor bedanken.

Weiterer Dank geht an PD Dr. Michael Winkler und Gregor Maschkowitz für die freundliche Bereitstellung von Antikörpern und weiteren Reagenzien.

Bei Annette Farkas möchte ich mich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Schließlich möchte ich vor allem noch meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden meinen Dank aussprechen, welche mich trotz der vielen Zeit, die ich in die Arbeit investiert habe immer unterstützt haben und mir ein starker Rückhalt waren.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Klages
Geburtsdatum: 13.05.1986
Geburtsort: Hannover

Beruf

Seit 01/2012 Assistenzarzt Chirurgische Klinik, Städtisches Klinikum Braunschweig
Seit 08/2014 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin und regelmäßige Tätigkeit als
Notarzt im öffentlichen Rettungsdienst der Stadt Braunschweig

Promotionsarbeit

Institut für Infektionsmedizin im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Prof. Dr. Helmut Fickenscher

Studium und Approbation

11/2011 Approbation als Arzt
10/2005 -11/2011 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Schulbildung

08/2002 – 06/2005 Friedrich-List-Schule, Hildesheim
08/1998 – 06/2002 Renataschule, Hildesheim
08/1996 – 07/1998 Orientierungsstufe Ost, Hildesheim
08/1992 – 06/1996 Grundschule Itzum, Hildesheim

11 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Braum O, **Klages M**, Fickenscher H (2013) The cationic cytokine IL-26 differentially modulates virus infection in culture. PLOS One 8: e70281. doi: 10.1371/journal.pone.0070281.

Braum O, **Klages M**, Fickenscher H (2011) Interleukin-26 enhances infection by Vesicular Stomatitis Virus, 21rd Annual Meeting of the Society for Virology, Freiburg.

Fickenscher H, **Klages M**, Braum O (2011) Interleukin-26 enhances infection by vesicular stomatitis virus, International Union of Microbiological Societies (IUMS), XV. International Congress of Virology, Sapporo.

Braum O, **Klages M**, Fickenscher H (2013) The cationic cytokine Interleukin-26 differentially modulates virus infection in culture, 23rd Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel.

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Abhandlung der vorliegenden Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer Prof. Dr. Helmut Fickenscher und Dr. Oliver Braum, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf wissenschaftlichen Tagungen veröffentlicht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich versichere zudem, dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und die vorliegende Arbeit nur in diesem Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Braunschweig, den 29.07.2015

Michael Klages