

**Untersuchung zur CMV-assoziierten Rolle des *Macrophage
Migration Inhibitory Factor* in der myokardialen
Parthanatose**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von Anna Roth

aus Schwerte

Dezember 2023

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in den CardioScienceLabs der Klinik für Kardiologie und Angiologie, Westdeutsches Herz- und Gefäßzentrum, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mirko Trilling des Instituts für Virologie am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

1. Gutachter*in: Prof. Dr. Peter Lüdike

2. Gutachter*in: Prof. Dr. Anke Hinney

Vorsitzende*r des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dominik Boos

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2024

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/81902

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240503-084331-7

Alle Rechte vorbehalten.

Zusammenfassung

Eine Infektion mit dem Zytomegalievirus (*cytomegalovirus*, CMV) stellt für immunsupprimierte Patient*innen ein großes Risiko dar und kann bei einer Infiltration des Herzens zu einer Myokarditis oder Vaskulopathie führen. Diese können mit lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen und Einschränkungen der Herzfunktion einhergehen und in einer Herzinsuffizienz resultieren. Die Hintergründe für die Herzschädigung sind derzeit noch unklar. Es ist jedoch bekannt, dass eine CMV-vermittelte Retinitis bei Immunschwäche zum Zelluntergang namens Parthanatose führt. Hierbei handelt es sich um einen kürzlich erforschten Zelltodmechanismus, der durch die Aktivierung der Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 (PARP-1), die Interaktion des *Macrophage migration inhibitory factors* (MIF) und des *Apoptosis inducing factors* (AIF) und die DNA-Fragmentierung in Abhängigkeit von MIF gekennzeichnet ist. Die Parthanatose wurde im Herzen bislang noch nicht beschrieben. In der vorliegenden Studie wird untersucht, ob es zu einer CMV-Infektion des Herzens bei Immunschwäche kommt und ob in den infizierten Zellen die Mechanismen der Parthanatose, insbesondere die DNA-Fragmentierung durch MIF, aktiviert werden.

Es konnte mit Hilfe des Plaque Assay gezeigt werden, dass murines CMV (mCMV) das Herz immunsupprimierter Mäuse infiziert. Im Gewebe konnte zudem aktive Virusreplikation mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nachgewiesen werden. *In vitro* wurde eine CMV-Infektion von Kardiomyozyten, kardialen Endothelzellen und Fibroblasten sowohl im murinen als auch im humanen System beobachtet. In infizierten Zellen konnte durch Immunfluoreszenzmarkierung gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg in der Synthese von PAR kam, was auf eine starke PARP-1 Aktivität hindeutete. Die dadurch bedingte Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien führte es zu einer Interaktion von MIF und AIF sowohl in murinen als auch in humanen kardialen Zellen. Diese Interaktion konnte mittels Proximity Ligation Assay und Co-Immunpräzipitation (Co-IP) validiert werden. Es wurden mittels Konfokalmikroskopie Hinweise darauf gefunden, dass der gebildete Proteinkomplex in den Zellkern migrierte. In kardialen Zellen aus MIF defizienten Mäusen konnte eine signifikante Reduktion von DNA-Schäden im Vergleich zu wildtypischen Zellen nachgewiesen werden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es zu einer CMV-Infektion im Herzen bei Immunschwäche kommt. Alle hauptsächlich im Herzen vertretenen Zelltypen werden dabei infiziert. Infizierte Zellen setzen den Zelluntergang durch Parthanatose in Gang, was durch eine Synthese von PAR, Interaktion von MIF und AIF und DNA-Fragmentierung gekennzeichnet ist. Diese Art des Zelluntergangs könnte zu einer enormen Gewebeschädigung und nachfolgenden Immunantwort führen. Es wurde zudem erstmals im Herzen gezeigt, dass eine Inhibition von MIF die DNA-Fragmentierung im Zuge der Parthanatose verringert, was einen neuen Therapieansatz für Patient*innen mit einer Herzschädigung nach CMV-Infektion darstellen könnte.

Summary

CMV infection poses a great risk for immunocompromised patients such as transplant recipients and can lead to infiltration of the heart and development of myocarditis or cardiac allograft vasculopathy. This can be accompanied by life threatening arrhythmia and sudden cardiac death or result in heart failure. The pathogenesis behind heart damage and the following poor prognosis are not yet understood. Studies have shown that CMV infection in an immunocompromised retinitis model leads to cell death via parthanatos. This recently published signaling pathway is characterized by over-activation of PARP-1, interaction of MIF and AIF and MIF-induced DNA fragmentation. Parthanatos has currently not been described in heart tissue. Therefore, we aim to investigate if CMV infects the heart of immunocompromised mice and if infected cells undergo cell death via parthanatos. Furthermore, we want to analyze the role of MIF in DNA fragmentation and cell death.

mCMV was found to infect cardiac tissue of immunocompromised mice using plaque assay and start active virus replication validated by PCR. In vitro studies could show that CMV infects different cardiac cell types such as cardiomyocytes, endothelial cells and fibroblasts as well in murine models as in human settings. Using immunofluorescence staining and confocal microscopy, we could see an uptake in PAR synthesis in infected cell compared to mock infected cells. This indicated an over-activation of PARP-1. The excessive synthesis of PAR lead to AIF release from mitochondria and furthermore to interaction of MIF and AIF in the cytosol, as shown via proximity ligation assay and co-IP. Immunofluorescence staining and confocal microscopy gave hints on the translocation of the MIF/AIF protein complex to the nucleus. Cardiac cells from MIF knockout mice infected with mCMV showed a significant reduce in DNA damage compared to wild type cells.

In summary, CMV infiltrates cardiac tissue after immune deficiency. Every main cardiac cell type is susceptible for infection. Infected exhibit signs of parthanatos such as PAR synthesis, MIF/AIF interaction and DNA fragmentation. This type of cell death could lead subsequently to further tissue damage and an excessive immune response, resulting in heart failure. In this study, we described for the first time that MIF knockout leads to a reduction in DNA fragmentation during parthanatos, providing a potential therapeutic targets for future investigations.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Zusammenfassung | I |
| Summary | II |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Zytomegalievirus | 1 |
| 1.2 Myokarditis | 2 |
| 1.3 Vaskulopathie | 4 |
| 1.4 Das Myokard | 4 |
| 1.5 Parthanatose | 5 |
| 1.6 <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> | 7 |
| 1.7 <i>Stat2</i> ^{-/-} Mausmodell | 8 |
| 2. Zielsetzung | 10 |
| 3. Material und Methoden | 12 |
| 3.1 Materialien | 12 |
| 3.1.1 Verbrauchsmaterial | 12 |
| 3.1.2 Chemikalien | 13 |
| 3.1.3 Zellkulturmedien und -lösungen | 15 |
| 3.1.4 Zelllinien, Maus- und Virusstämme | 16 |
| 3.1.5 Antikörper und Färbesubstanzen | 17 |
| 3.1.6 Primer | 18 |
| 3.1.7 Kommerzielle Assays und Kits | 18 |
| 3.1.8 Geräte und Software | 19 |
| 3.1.9 Puffer und Lösungen | 20 |
| 3.2 Methoden | 21 |
| 3.2.1 Tierhaltung | 21 |
| 3.2.2 <i>Mif</i> ^{-/-} Zucht | 22 |
| 3.2.3 Isolation von kardialen Zellen | 22 |
| 3.2.3 Kultivierung von Primärzellen | 24 |
| 3.2.4 Humane Zellkultur | 24 |
| 3.2.5 Zellzählung | 25 |
| 3.2.6 Infektion von Mäusen | 25 |
| 3.2.7 Infektion von Zellen | 26 |
| 3.2.8 Serumgewinnung aus Mäusen | 26 |
| 3.2.9 Bestimmung der Viruskonzentration im Gewebe | 27 |
| 3.2.10 PCR | 28 |
| 3.2.11 Troponin-Bestimmung | 30 |
| 3.2.12 Immunfluoreszenzfärbung | 32 |
| 3.2.13 Proximity Ligation Assay | 32 |
| 3.2.14 Co-Immunpräzipitation | 33 |

| | |
|--|----|
| 3.2.15 LDS-Gelelektrophorese | 34 |
| 3.2.16 Western Blot | 35 |
| 3.2.17 Quantifizierung des Zellschadens | 36 |
| 3.2.18 Statistik | 37 |
| 4. Ergebnisse | 38 |
| 4.1 Cytomegalovirus infiziert Herzgewebe | 38 |
| 4.1.1 Cytomegalovirus infiltriert kardiales Gewebe immunsupprimierter Mäuse | 38 |
| 4.1.2 Cytomegalovirus repliziert im Herzgewebe | 39 |
| 4.1.3 Untersuchung der Herzschädigung in CMV-infizierten Mäusen | 41 |
| 4.1.4 Cytomegalovirus infiziert verschiedene kardiale Zelltypen | 43 |
| 4.2 Cytomegalovirus führt in infizierten Zellen zur Parthanatose | 47 |
| 4.2.1 Kardiale Zellen zeigen PARP-1 Aktivierung nach Infektion mit CMV | 47 |
| 4.2.2 MIF bildet mit AIF den für die Parthanatose notwendigen Proteinkomplex in CMV-infizierten kardialen Zellen | 51 |
| 4.2.3 Der Proteinkomplex aus MIF und AIF ist im Zellkern lokalisiert | 55 |
| 4.3 Eine Inhibition von MIF führt zu einer Verringerung an DNA-Schäden nach CMV-Infektion | 59 |
| 5. Diskussion | 63 |
| 5.1 CMV infiziert kardiale Zellen | 63 |
| 5.2 CMV-infizierte Zellen lösen Parthanatose aus | 64 |
| 5.3 MIF agiert als Effektorprotein in der Parthanatose | 65 |
| 5.4 Beurteilung des Projekts | 66 |
| 5.5 Zukünftige Untersuchungen | 66 |
| 6. Abkürzungsverzeichnis | 69 |
| 7. Abbildungsverzeichnis | 71 |
| 8. Tabellenverzeichnis | 72 |
| 9. Literaturverzeichnis | 73 |
| Danksagung | 80 |
| Lebenslauf | 82 |
| Eidesstattliche Erklärung | 84 |

1. Einleitung

Für immungeschwächte Patient*innen stellen Virusinfektionen ein hohes Risiko dar. Insbesondere Infektionen oder Reaktivierungen mit dem humanen Zytomegalievirus (*human cytomegalovirus*, hCMV; Humanes Herpesvirus 5) können Erkrankungen verschiedener Organe, unter anderem des Herzens und der Gefäße, auslösen. Die Folge sind eine okkludierende Vaskulopathie oder Myokarditis, die in einer Herzinsuffizienz münden können. Bei der Myokarditis handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung des Herzmuskels, die potenziell von Herzrhythmusstörungen begleitet werden und in einem plötzlichen Herzstillstand münden kann (1). Ebenso ist eine dauerhafte Herzschädigung aufgrund des Absterbens kardialer Zellen und einer überschießenden Immunreaktion möglich. In anderen Fällen heilt die Erkrankung ohne Langzeitfolgen aus (2). Welche Mechanismen wie z.B. Zelluntergang oder Expression von Effektorproteinen eine Rolle für den unterschiedlichen Verlauf spielen, ist bis heute nicht ausreichend bekannt. Um verantwortliche Signalwege und daran beteiligte Proteine zu identifizieren und eine mögliche Therapie zu entwickeln, ist wissenschaftliche Forschung von immenser Bedeutung. Diese Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten.

1.1 Zytomegalievirus

hCMV gehört zur Familie der Betaherpesviren. Wie alle Herpesviren verbleibt es nach der Erstinfektion lebenslang im Körper (Latenz). Die initiale Infektion verläuft oft mild oder symptomlos, kann aber bei einer Schwächung des Immunsystems und der darauffolgenden Reaktivierung zu schweren Erkrankungen führen (3). Ein Großteil der Weltbevölkerung gilt als infiziert, die Seroprävalenz liegt zwischen 33 und 81% für Industrienationen und zwischen 59 und 95% für Entwicklungsländer (4).

Die Krankheitsbilder bei Reaktivierung können vielfältig sein. Bei AIDS-Patient*innen tritt oft eine CMV-vermittelte Retinitis, eine Entzündung der Netzhaut, auf, die unkontrolliert zur Erblindung führen kann (5). Generelle Anzeichen einer CMV-Infektion können Fieber und Erschöpfung sein. Bei einer Infektion des Herzgewebes und einem Untergang von kardialen Zellen können Einschränkungen der Pumpleistung auftreten, die sich in Brustschmerzen, Atemnot oder Herzrhythmusstörungen äußern können (6).

Es gibt zwei Möglichkeiten, eine hCMV-Reaktivierung zu bekämpfen: Die Gabe von Virostatika sobald CMV-DNA mittels PCR nachgewiesen werden kann oder eine prophylaktische Gabe z.B. direkt nach Organtransplantation (7, 8). Erstere Strategie birgt das Risiko, eine Reaktivierung möglicherweise zu spät zu erfassen. Zweitere führt mitunter nur zu einer verspäteten Reaktivierung mit gleichzeitiger Resistenz gegen die eingesetzten Virostatika (9).

Zudem verursachen viele gängige Arzneimittel gegen hCMV-Infektionen Nebenwirkungen wie Anämie, Verlust von Neutrophilen (Neutropenie), Leukozyten (Leukopenie) oder Thrombozyten (Thrombozytopenie) sowie Halluzinationen (10).

hCMV ist in der Lage, verschiedene Zellen des menschlichen Körpers zu infizieren, darunter Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen sowie Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und dendritische Zellen (11). Nach dem Andocken des Viruspartikels an die Wirtszelle durch Interaktion von viralen Glykoproteinen mit Rezeptoren an der Zelloberfläche wird das Virus in die Zelle aufgenommen (12). Dort wandert es bis zum Zellkern, wo die Transkription, Genreplikation und der Zusammenbau neuer Viruskapside stattfindet. Tegumentproteine bremsen währenddessen den Beginn der Immunantwort aus und regulieren die virale Genexpression (13). Je nach Zeitpunkt im Replikationszyklus werden die synthetisierten Proteine in verschiedene Kategorien eingeteilt: sehr früh (*immediate early*, IE), verzögert (*delayed early*, DE) und spät (*late*, L) (14). Nach dem Ausbrechen der viralen Kapside aus dem Zellkern nutzen diese den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum der Wirtszelle für den vollständigen Zusammenbau zu infektiösen neuen Viruspartikeln und werden anschließend aus der Zelle geschleust (15, 16).

Um die Auswirkungen einer CMV-Infektion auf kardiale Zellen zu erforschen, sind geeignete Tiermodelle notwendig. CMV ist jedoch streng wirtsspezifisch, sodass für *in vivo* Experimente im Mausmodell das eng verwandte murine Zytomegalievirus (*murine cytomegalovirus*, mCMV; Murines Herpesvirus 1) verwendet werden muss.

In einem murinen AIDS-Modell wurde bereits gezeigt, dass mCMV zu Retinitis führt. Hierbei gehen Zellen durch einen Zelltodmechanismus namens Parthanatose zugrunde (17). Dies könnte auch der Fall für kardiale Zellen im Rahmen der Vaskulopathie oder Myokarditis sein, was bis heute noch nie untersucht wurde.

1.2 Myokarditis

Jährlich erkranken weltweit etwa 10-100 pro 100.000 Menschen an einer Myokarditis (18). Hierbei handelt es sich um eine Entzündung des Herzmuskels (Myokard). Hierbei kann es zu einem Gewebeschaden kommen, der in Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien), linksventrikulärer Dysfunktion oder Herzinsuffizienz resultieren kann (19). Ebenso steigt das Risiko für einen plötzlichen Herzstillstand. Eine besonders schwere Form, die fulminante Myokarditis, ist oft die Ursache für einen kardiogenen Schock (20). Die Pathogenese und das Zusammenspiel zwischen Infektionen, Zelluntergang und einer überschießenden Immunreaktion im Herzen ist bislang noch weitgehend unverstanden.

Einer Mehrheit der Myokarditis-Erkrankungen geht eine virale Infektion voran. Daneben können jedoch auch andere Pathogene eine Rolle spielen (21, 22). Die viralen Erreger können ebenso vielfältig sein und reichen von kardio-, vaskulo- oder lymphotropen Viren bis hin zu solchen, die im gesamten Organismus starke Entzündungsreaktionen provozieren, wie etwa Influenzaviren (21). Auch Infektionen mit multiplen Erregern sind möglich (23).

Unter den lymphotropen Viren spielen insbesondere Herpesviren eine Rolle, zu denen das humane Zytomegalievirus (*human cytomegalovirus*, hCMV) zählt. Herpesviren verbleiben nach der Erstinfektion latent im Organismus und können bei einer Schwächung des Immunsystems reaktiviert werden. Dies stellt insbesondere für immunsupprimierte Patient*innen wie etwa Krebspatient*innen, Säuglinge oder Organtransplantierte ein erhöhtes Risiko dar (3, 24, 25). Vor einer Transplantation wird daher auch der hCMV-Status von Spender*in und Empfänger*in beurteilt.

Die einer viralen Infektion folgende Immunreaktion kann in zwei Phasen eingeteilt werden: die der angeborenen Immunantwort innerhalb der ersten sieben Tage und die adaptierte Immunantwort, die bis zu vier Wochen andauern kann (21). Darüber hinaus kann die akute Myokarditis auch einen chronischen Verlauf nehmen. Im Zuge der angeborenen Immunantwort kommt es zu einer massiven Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Interferonen und Alarminen, was zu einer Aktivierung und Einwanderung von Immunzellen wie Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen führt (26). Obschon die Einwanderung von Immunzellen der Bekämpfung des viralen Infektes zugutekommt, sorgt eine übermäßige oder chronische Aktivierung des Immunsystems für einen erhöhten Schaden am Herzgewebe durch Zelluntergang oder Funktionsverlust (27). Dies resultiert letztendlich in einer Funktionsstörung des Herzens.

Die Diagnose einer Myokarditis gestaltet sich aufgrund ihres vielfältigen Erscheinungsbildes als schwierig. Der Goldstandard unter den nicht invasiven Untersuchungen ist die Magnetresonanztomografie (MRT) (28). Hierbei können durch Zugabe von Kontrastmittel im Herzgewebe Bereiche mit Entzündung, Fibrose oder untergegangenen Zellen identifiziert werden. Diagnostische Marker für eine Gewebeschädigung wie kardiales Troponin können weiterhin Aufschluss über den Grad des Herzschadens geben. Für den eindeutigen Erregernachweis ist jedoch eine Herzbiopsie erforderlich. Ebenso können hiermit die Entzündungsvorgänge besser charakterisiert werden (29, 30). Diese Erkenntnisse ermöglichen eine zielgerichtete Therapie für die betroffenen Patient*innen.

Um die Infektion einzudämmen, stehen Antibiotika oder Virostatika zur Verfügung. Das Konzept der personalisierten Medizin sieht eine Behandlung nach den individuellen Kriterien der einzelnen Patient*innen vor. Hierzu muss jedoch das Zusammenspiel zwischen Infektion, Immunreaktion und Zelluntergang noch besser erforscht werden.

1.3 Vaskulopathie

Ähnlich wie eine Myokarditis kann bei immungeschwächten Patient*innen, insbesondere Organspendeempfänger*innen auch eine Transplantatvaskulopathie auftreten. Diese ist in der Regel durch eine langsame Okklusion der das Herz versorgenden Gefäße durch eine Hyperplasie der innersten Schicht eines Blutgefäßes, der Intima, gekennzeichnet (31). In einigen Fällen kann dieser Vorgang allerdings innerhalb von Monaten zu einem vollständigen Verschluss des betroffenen Gefäßes führen (32). Dies schränkt die Versorgung des Herzens mit Sauerstoff und Nährstoffen ein, sodass es zum Funktionsverlust kommen kann, was Einfluss auf das langfristige Patientenüberleben nach einer Herztransplantation nimmt (33, 34). Es besteht ein enger Zusammenhang mit einer CMV-Infektion, bei der es zu einer Schädigung von Endothelzellen im Rahmen von Zelluntergang und Wachstumshemmung und somit einer verminderten Gefäßbildung kommen kann (35). Auch bei dieser Erkrankung sind die den Verlauf bestimmenden Signalwege und Proteine noch nicht ausreichend erforscht.

Der Untergang von Endothelzellen spielt jedoch eine zentrale Rolle. Durch die so entstehende Minderdurchblutung des Herzens kann es zu einer Schädigung oder sogar Absterben von Kardiomyozyten kommen. Dies hat wiederum einen direkten Einfluss auf die Herzfunktion. Schlussendlich kann die CMV-vermittelte Vaskulopathie in einer Herzinsuffizienz enden.

1.4 Das Myokard

Das Myokard liegt zwischen dem Epikard und dem Endokard und leistet die Pumpfunktion des Herzens. Es besteht zum größten Teil aus Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Die Kardiomyozyten machen etwa die Hälfte der Masse und bis zu 80% des Volumens aus (36, 37). Sie erscheinen *in vitro* stäbchenförmig und verfügen in der Regel über einen oder zwei Zellkerne. Untereinander sind sie über Glanzstreifen (*Disci intercalares*) verbunden (38).

Innerhalb der Zellen befinden sich die für die Kontraktion verantwortlichen Myofibrillen, welche aus Aktin- und Myosinfilamenten, die parallel angeordnet sind, bestehen und den Kardiomyozyten ihre charakteristische Querstreifung verleihen. Für die Kontraktion wird viel Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt (39), weshalb die Energiegewinnung über die Mitochondrien essenziell ist. Die Kontraktion der Kardiomyozyten bildet die Schlagbewegung des Herzens. Aus diesem Grund sind funktionsfähige Kardiomyozyten für den Organismus überlebenswichtig.

Der Anteil an Endothelzellen ist unter den Nicht-Myozyten im Herzgewebe am höchsten (40). Sie bilden die Gefäße, die die Kardiomyozyten mit Sauerstoff und den zum Überleben notwendigen Nährstoffen versorgen. Fernerhin kontrollieren sie den Blutfluss, die

Gefäßbildung (Angiogenese) und ggf. die Einwanderung von Immunzellen im Fall einer Infektion (41). Ein Untergang an Endothelzellen steht somit oft auch im Zusammenhang mit einer Schädigung der Kardiomyozyten.

Die Fibroblasten bilden die nächstgrößere Zellpopulation im Herzen. Sie bilden die extrazelluläre Matrix und sind somit für den Zusammenhalt des Herzgewebes verantwortlich (42). Weiterhin sind sie wesentlich an der Narbenbildung nach einem Untergang von Kardiomyozyten beteiligt. Im Fall des akuten Myokardinfarkts beispielsweise werden Fibroblasten aktiviert und bilden durch Synthese von Kollagen eine fibrotische Narbe, die zunächst die beschädigten Ventrikel stabilisiert (43). Diese Narbe kann jedoch die Pumpleistung des Herzens nicht ausüben.

Bei einer Infektion des Myokardgewebes im Rahmen einer virusinduzierten Myokarditis kann eine Schädigung aller drei Zellpopulationen fatal sein. Ein Verlust von Endothelzellen führt zu einer verminderten Durchblutung, was sich wiederum auf die Kardiomyozyten auswirkt. Ein Untergang von Fibroblasten kann eine Destabilisierung des Herzgewebes und eine verringerte Wundheilung zur Folge haben. Eine Schädigung oder Untergang von Kardiomyozyten wie durch Parthanatose führt neben dem Verlust der Kontraktilität zu einer Aktivierung von Fibroblasten und einer vermehrten Fibrose im Herzen. Die Pumpleistung des Herzens wird gesenkt, was langfristig zu Anpassungsstrategien (Remodeling) führt, die auf Dauer wiederum die Herzfunktion verschlechtern (44).

1.5 Parthanatose

Die Parthanatose ist ein Caspase-unabhängiger Zelltodmechanismus, der erstmals 2009 beschrieben wurde (45). Es handelt sich hierbei um eine Variante der programmierten Nekrose (46). Die Parthanatose wird durch Schäden an der nukleären DNA ausgelöst. Das Enzym Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 (PARP-1), welches normalerweise unter hohem Energieverbrauch die DNA-Reparatur begünstigt (47), wird hierbei in einem Übermaß aktiviert. Diese Überaktivierung führt zur Bildung von langen Poly-(ADP)-Ribose (PAR)-Polymeren, die in einem weiteren Schritt die Freisetzung von AIF ins Zytosol begünstigen (48). AIF bindet nach der Freisetzung im Zytosol an den *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF). Der Komplex migriert in den Zellkern, wo MIF mittels seiner Endonuklease-Aktivität die Fragmentierung der DNA induziert (Abb. 1) (49).

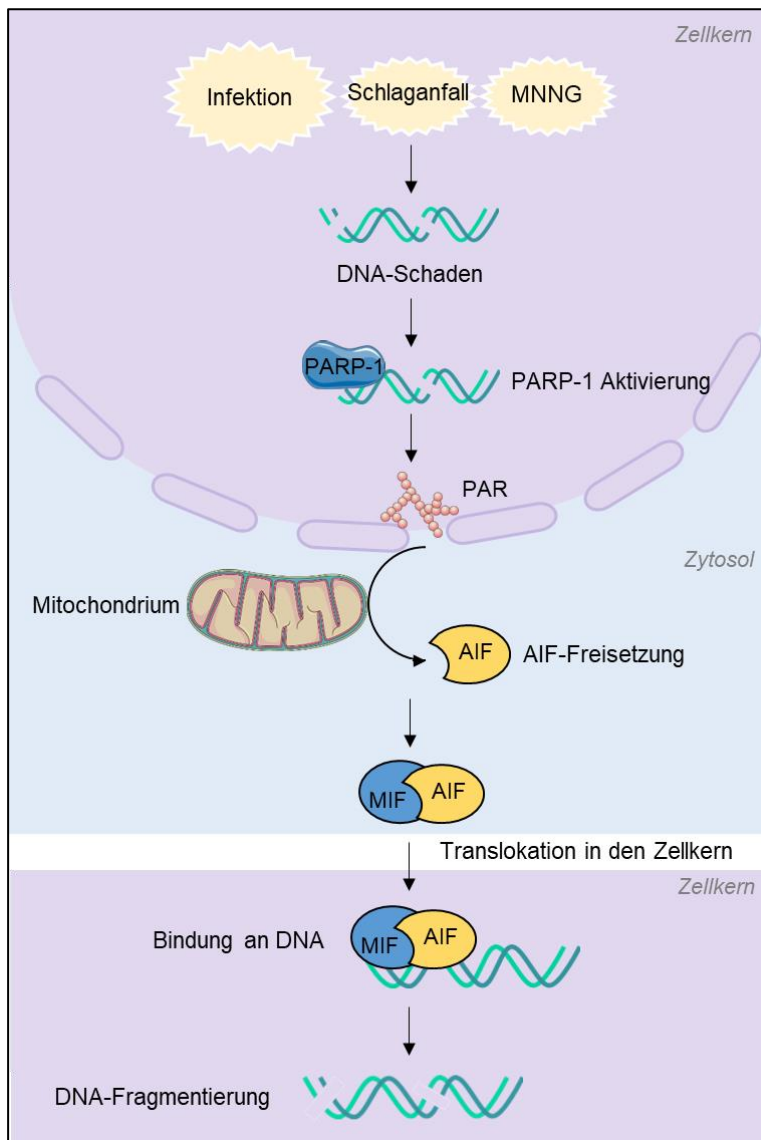


Abb. 1: Schematische Darstellung der Parthanatose.

Schäden an der DNA, hervorgerufen im Rahmen von Infektionen, einem Schlaganfall oder dem Toxin N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), führen zur Aktivierung der Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 (PARP-1). Die folgende Synthese des Poly-ADP-Ribose (PAR-) Polymers führt zur Freisetzung des *Apoptosis inducing factors* (AIF) aus den Mitochondrien ins Zytosol. Dort bindet AIF an den *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF). Der Proteinkomplex transloziert in den Zellkern und bindet an die DNA, wo MIF die Fragmentierung der DNA auslöst und somit den Zelltod herbeiführt. Modifiziert nach Wang *et al.*, 2016 (49).

Untersuchungen haben gezeigt, dass bei einer genetischen Modifikation oder Deletion von MIF die Bindung an AIF nicht mehr stattfinden kann. Da MIF über eine Endonuklease-Funktion verfügt und DNA zerlegen kann, wird der Zelltod ohne Translokation von MIF in den Zellkern somit verhindert (49). MIF ist somit ein entscheidender Faktor für das Absterben von Zellen durch Parthanatose, da durch die Fragmentierung die Zelle keine Proteinsynthese mehr

betreiben kann. Zusätzlich wird durch diese Art des Zelluntergangs sichergestellt, dass potenziell schädliche DNA entfernt wird, um die Genomintegrität zu bewahren (50).

Durch die Parthanatose gelangt Zellinhalt in das umliegende Gewebe, sodass es sich um einen lytischen Zelltodmechanismus handelt (51). Dies hat eine Aktivierung des Immunsystems zur Folge, wodurch es Entzündungsreaktionen kommt und auch die benachbarten Zellen Schaden nehmen. Im Herzen wurde die Parthanatose bislang nicht untersucht.

1.6 Macrophage migration inhibitory factor

1966 wurde der *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) im Überstand von Antigen-sensibilisierten Lymphozyten gefunden (52). MIF ist ein Zytokin mit chemotaktischen Eigenschaften, welches eine gerichtete Migration verschiedener Leukozyten bewirkt (53). Es wird von vielen Zelltypen exprimiert und hat sowohl positive als auch negative Eigenschaften in Herzkreislaufkrankungen (54). Im Rahmen des akuten Myokardinfarkts wirkt MIF in der frühen Phase der Reperfusion durch seine Oxidoreduktase-Aktivität kardioprotektiv (47, 55, 56). Auf der anderen Seite ist MIF an vielen entzündlichen Prozessen beteiligt wie etwa bei der Bildung von atherosklerotischen Plaques, indem es Monozyten rekrutiert (57).

Die durch MIF vermittelte Immunantwort ist nicht nur im Infarktmodell zu sehen, bei dem MIF-defizitäre Mäuse bei einer Ischämie über 30 min eine geringere Infarktgröße aufwiesen (58), sondern auch in Patient*innen mit Herzinsuffizienz. Eine erhöhte MIF-Konzentration im Blutplasma korreliert hierbei mit einer schlechteren Prognose (54). Dies könnte auch bei der CMV-vermittelten Herzschädigung eine Rolle spielen. Auch hier könnten erhöhte MIF-Level im Herzgewebe zu einer Verschlechterung der Prognose führen. MIF könnte somit ein potenzieller Risikofaktor für den schweren Verlauf einer Transplantatvaskulopathie oder Myokarditis sein. Den Einfluss von MIF auf den Zelluntergang, insbesondere nach CMV-Infektion, wurde im Herzen bislang noch nicht untersucht.

MIF übt eine wichtige Funktion mittels seiner Endonuklease-Aktivität in der Vermittlung der Parthanatose aus (49). Dies wurde bisher jedoch nur im Gehirn beschrieben. Auch im Rahmen der Parkinson-Erkrankung ist MIF am Untergang von Neuronen durch Parthanatose beteiligt (59). In dieser Studie wurde auch erstmals ein gezielter Inhibitor von MIFs Endonuklease-Aktivität entwickelt. Sollte MIF auch am Untergang kardialer Zellen mittels Parthanatose beteiligt sein, könnte dies ein vielversprechender Weg für zukünftige Therapiemaßnahmen sein.

1.7 *Stat2*^{-/-} Mausmodell

Als Antwort auf eine virale Infektion werden Zytokine, insbesondere Interferone, sekretiert. Diese haben nicht nur intrazellulär eine antivirale Aktivität, indem sie das Transkriptom und Proteom verändern (60), sondern beeinflussen auch die extrazelluläre Immunantwort (61). Interferone binden an Oberflächenrezeptoren, die im weiteren Verlauf Januskinasen aktivieren. Diese phosphorylieren und aktivieren *signal transducers and activators for transcription* (STAT), welche mit dem *Interferon regulatory factor 9* (IRF9) interagieren und einen Transkriptionsfaktorkomplex bilden (62). Dieser sorgt anschließend für die Transkription Interferon-regulierter Gene, die zur Bekämpfung der Infektion essenziell sind (Abb. 2). Besonders STAT2 spielt eine wichtige Rolle in der Signalkaskade von Interferon I bis III, weshalb Menschen und Tiere ohne STAT2 eine starke Immunschwäche aufweisen und sehr anfällig für Infektionen sind (63, 64).

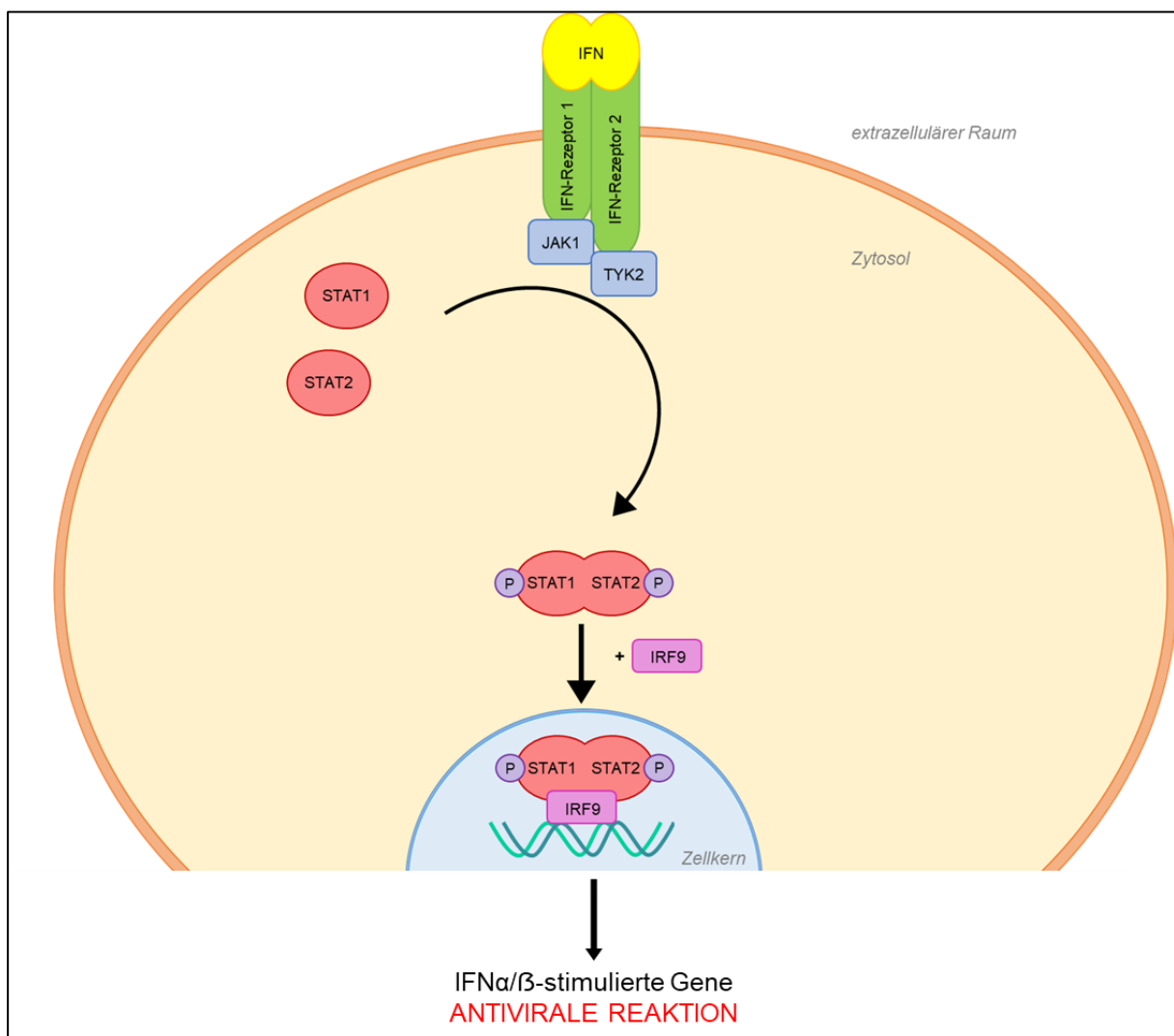


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung des IFN-STAT-Signalwegs.

Interferone binden außerhalb der Zelle an dafür vorgesehene Rezeptoren. Diese aktivieren intrazellulär Januskinase 1 (JAK1) und Tyrosinkinase 2 (TYK2), welche wiederum STAT1 und STAT2

1. Einleitung

phosphorylieren. Der somit aktivierte Komplex bildet mit IRF9 einen Transkriptionsfaktorkomplex und bindet an die DNA. In Folge werden Gene abgelesen, deren Genprodukte antivirale Effekte haben. Modifiziert nach Blaszczyk *et al.*, 2016 (65).

Das Fehlen der über STAT2 vermittelten antiviralen Immunantwort lässt sich mit einer genetisch veränderten Mauslinie hervorragend umsetzen. Es steht somit ein Mausmodell zur Verfügung, welches der Immunsuppression ähnelt, die zur Anfälligkeit für eine Herzschiädigung nach CMV-Infektion führt. Zudem zeigen Mäuse bereits im jungen Alter eine erhöhte Anfälligkeit für eine CMV-Infektion, sodass dies auch dem klinischen Bild ähnelt, nachdem häufig jüngere Patient*innen erkranken.

2. Zielsetzung

Die Immunmechanismen, die im Rahmen einer Myokarditis oder Vaskulopathie nach CMV-Infektion zu teils überschießenden Reaktionen und Herzmuskeldestruktionen führen sind aufgrund der schwierigen Zugänglichkeit zu myokardialem Gewebe zu großen Teilen noch unverstanden. Besonders für immunsupprimierte Patient*innen stellt eine hCMV-assoziierte Myokarditis eine Gefährdung dar, eine Infektion oder Reaktivierung führt darüber hinaus chronisch zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie. In Folge einer Infektion oder Reaktivierung können Arrhythmien auftreten, die lebensbedrohlich sein können (66, 67). Auch Folgeschäden sind möglich, die in einer entzündlichen Kardiomyopathie oder Herzinsuffizienz enden (21). Es ist unklar, welche Mechanismen hinter der Gewebeschädigung stehen und was für einen Teil der Betroffenen die schlechte Prognose bedingt. Ebenso ist nicht bekannt, auf welche Art es zum Untergang kardialer Zellen kommt. HCMV infiziert und repliziert potenziell in Endothelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten (11), es ist jedoch nicht sicher, dass dies für alle Zelltypen im Herzgewebe zutrifft. Die aktuellen Therapieoptionen sind größtenteils symptomatisch (68) oder direkt gegen die Infektion gerichtet, was teils starke Nebenwirkungen mit sich bringt. In einem Mausmodell CMV-vermittelter Retinitis kommt es zum Zelluntergang durch Parthanatose (17, 69). Im Rahmen von Schlaganfall und Parkinson konnte gezeigt werden, dass MIF bei dieser Art des Zelluntergangs eine entscheidende Funktion ausübt (49, 59). Bislang ist noch unbekannt, ob eine CMV-Infektion auch in kardialen Zellen zur Parthanatose führt und ob MIF daran beteiligt ist. Ausgehend von dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand ergeben sich folgende Fragestellungen.

1. Welche kardialen Zelltypen sind anfällig für eine CMV-Infektion?
2. Wird in den infizierten Zellen der Zelluntergang durch Parthanatose ausgelöst?
3. Ist MIF an der Parthanatose im Herzen beteiligt?
4. Kann eine Deletion oder Inhibition von MIF das Zellüberleben verbessern?

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen soll ein Mausmodell verwendet werden, was der Immunsuppression von Patient*innen ähnelt, die anfällig für eine Herzschädigung nach CMV-Infektion sind. Hierzu wurden Untersuchungen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. Mirko Trilling des Instituts für Virologie am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Bei den verwendeten Mäusen wurde das *Stat2*-Gen deletiert, weshalb die durch Interferon vermittelte antivirale Signalkaskade gestört ist.

Um die Auswirkungen von MIF auf die Parthanatose und den Zelluntergang zu untersuchen, wurde ein genetisch veränderter Mausstamm verwendet, dessen *Mif*-Gen deletiert wurde. Um einzelne kardiale Zellpopulationen zu untersuchen, wurden diese aus dem adulten

2. Zielsetzung

Mausherzen isoliert. Weiterhin wurden humane kardiale Zellen untersucht, um die Parthanatose nach hCMV-Infektion auch im Menschen nachweisen zu können.

3. Material und Methoden**3.1 Materialien****3.1.1 Verbrauchsmaterial**

Die verwendeten Materialien und Geräte entsprechen der allgemeinen Laborausstattung. Darüber hinaus besondere verwendete Materialien und Geräte sind im Folgenden aufgelistet.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Materialien mit Herstellerangaben.

| Material | Artikelnummer | Hersteller |
|---|----------------------|--|
| Duran Deckgläser, 24x60 mm | 235503601 | Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Gefäßklemme | 13012-12 | Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Kammerobjektträger, 8 well | 80841 | ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland |
| Kammerobjektträger, 12 well | 81201 | ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland |
| Luer-Lock Schlauchadapter (männlich) für weiche Schläuche | 15668 | Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland |
| Mini-Reduzier-Schlauchtülle ohne Steg | 29152 | Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland |
| Schlauch für Rollerpumpe, rot- grau-rot | VERN070535-14-ND | VWR International, Radnor, USA |
| Spritzenvorsatzfilter, 0,22 µm | 16534-----K | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland |
| Tygon Schlauch Ø 2,4 mm | 92690 | Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland |
| Zellsieb 40 µm, steril | 352340 | Corning, Inc., New York, USA |
| Zellsieb 100 µm, steril | 431752 | Corning, Inc., New York, USA |

3.1.2 Chemikalien

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien mit Herstellerangaben.

| Chemikalie | Artikelnummer | Hersteller |
|--|---------------|--|
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | HN78.1 | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Amphotericin B-Lösung | A2941 | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | 8076.4 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| CD31-Microbeads | 130-097-418 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland |
| D-(+)-Glukose-Monohydrat | 16301-250G | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) | 14190-094 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Eindeckmedium Prolong Gold Antifade | P36934 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | 15575020 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Fetales Kälberserum (fetal bovine serum, FBS) | F2442 | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Fettfreie Trockenmilch | T145.1 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Gentamycin | 15750-060 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Kaliumchlorid (KCl) | HN02.1 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Kollagenase Typ 2 | LS004176 | Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA |
| Kollagenase Typ 4 | LS004188 | Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA |

3. Material und Methoden

| | | |
|--|-------------|--|
| Laminin | 11243217001 | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | KK36.1 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Methylzellulose | M7027-100G | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | S7653-250G | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O) | 71500-250G | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumhydroxid (NaOH), 2 N | 182158.1211 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Protease aus Streptomyces griseus, Typ XIV | P5147 | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| RNA Protect Tissue Reagent | 76104 | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Salzsäure, (HCl), 1 N | H9892-100ML | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Taurin | T0625-25G | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Triton X-100 | X100-500ML | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Trypanblau | T8154-20ML | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Tween 20 | 9127.2 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Zellschrottentferner (Debris Removal Solution) | 130-109-398 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland |

3.1.3 Zellkulturmedien und -lösungen

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Medien und Lösungen in der Zellkultur mit Herstellerangaben.

| Medium oder Lösung | verwendet für | Artikelnummer | Hersteller |
|--|--------------------------------|---------------|---|
| Fibroblasten-Kulturmedium bestehend aus DMEM/F12 1:1 mit 10% (v/v) FBS 50 µg/mL Gentamycin 50 ng/mL Amphotericin B | murine kardiale Fibroblasten | 11320033 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| EGM Endothelzell-Wachstumsmedium mit Zusätzen (EGM Endothelial Growth Medium BulletKit) | murine kardiale Endothelzellen | CC-3124 | Lonza Group AG, Basel, Schweiz |
| Endothelzell-Wachstumsmedium (Endothelial Cell Growth Medium MV) | HCAECs | C-22020 | PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Fibroblasten-Wachstumsmedium 3 (Fibroblast Growth Medium 3) | HCFs | C-23025 | PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Kardiomyozyten-Kulturmedium bestehend aus M199-Medium mit 5% FBS 50 µg/mL Gentamycin 50 ng/mL Amphotericin B | murine Kardiomyozyten | M4530 | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| MEF-Kulturmedium DMEM mit 10% (v/v) FBS 100 µg/mL Streptomycin 100 U/mL Penicillin 2 mM Glutamin | MEFs, MNCs | 41965-039 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Myozyten-Wachstumsmedium | HCMs | C-22070 | PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland |

| | | | |
|--------------------------------|---------------|---------|---|
| (Myocyte Growth Medium) | | | |
| Zellablösungs-Kit (Detach Kit) | humane Zellen | C-41220 | PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland |

3.1.4 Zelllinien, Maus- und Virusstämme

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Zelllinien, Maus- und Virusstämme mit Herstellerangaben.

| Stamm oder Zelllinie | Artikelnummer | Hersteller |
|--|---------------|---|
| 129S2/SvHsd Maus | | AG Trilling |
| Balb/C Maus | | Eigene Zucht |
| embryonale Mausfibroblasten (<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , MEFs) | | AG Trilling |
| Humane kardiale Fibroblasten (<i>human cardiac fibroblasts</i> , HCFs) | C-12375 | PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Humane Kardiomyozyten (<i>human cardiomyocytes</i> , HCMs) | C-12810 | PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Humane koronararterielle Endothelzellen (<i>human coronary artery endothelial cells</i> , HCAECs) | C-12221 | PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Humanes Zytomegalovirus, EGFP-exprimierend (<i>human cytomegalovirus</i> , EGFP-hCMV) | | AG Trilling |
| <i>Mif</i> ^{-/-} Maus | | Eigene Zucht |
| Murines Zytomegalovirus (<i>murine cytomegalovirus</i> , mCMV), Smith Stamm (WT) | | AG Trilling, nach Jordan <i>et al.</i> , 2011 |

| | |
|---|---|
| Murines Zytomegalovirus, EGFP-exprimierend (EGFP- mCMV), Smith Stamm | AG Trilling |
| Murines Zytomegalovirus, Cherry-exprimierend (mCherry-mCMV), Smith Stamm | AG Trilling, modifiziert durch Insertion des <i>mCherry</i> -Gens unter des hCMV-IE- Promoters |
| neugeborene Mauszellen (<i>neonatal mouse cells</i> , NMCs) | AG Trilling |
| <i>Stat2</i> ^{-/-} Maus | AG Trilling |

3.1.5 Antikörper und Färbesubstanzen

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Färbesubstanzen mit Herstellerangaben.

| Antikörper / Substanz | verwendet in Versuchsteil (mit Verdünnung) | Artikelnummer | Hersteller |
|---|--|---------------|---|
| 4',6-Diamidino-2- phenylindol (DAPI) | Immunfluoreszenzfärbung (1:4000) | D1306 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Kaninchen anti γH2A.X | Immunfluoreszenzfärbung (1:200) | 2577S | Cell Signaling Technology, Danvers, USA |
| Kaninchen anti MIF | PLA, Immunfluoreszenzfärbung (1:100), Western Blot (1:1000) | ab187064 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| Maus anti AIF | Co-IP (10 µg/1,5 mg Beads) | sc-13116 | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA |
| Maus anti AIF | PLA, Immunfluoreszenzfärbung (1:100), Western Blot (1:1000) | ab110327 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |

3. Material und Methoden

| | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|-------------|---|
| Maus anti Glykoprotein B | Immunfluoreszenzfärbung (1:200) | HR-MCMV-14 | Capri – Center for proteomics, Rijeka, Kroatien |
| Maus anti Tegumentprotein pp65 | Immunfluoreszenzfärbung (1:100) | ab6503 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| Maus anti PAR | Immunfluoreszenzfärbung (1:100) | 4335-MC-100 | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| Veriblot Detektionsreagenz | Western Blot (1:2000) | ab131366 | Abcam, Cambridge, Großbritannien |

3.1.6 Primer

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Primer

| Primer | Sequenz | Quelle |
|-------------|-----------------------------|----------------------------------|
| IE1 forward | 5'-TGACCACGTGGGGAATGATA-3' | Schupp <i>et al.</i> , 2016 |
| IE1 reverse | 5'-GGTGTGCAATCTTACAGGACA-3' | Schupp <i>et al.</i> , 2016 (70) |

3.1.7 Kommerzielle Assays und Kits

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Assays und Kits mit Herstellerangaben.

| Assay / Kit | Artikelnummer | Hersteller |
|--|---------------|---|
| Duolink® In Situ Rot Starterkit Maus/Kaninchen | DUO92101 | Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Dynabeads Co-Immunoprecipitation Kit | 14321D | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | 205311 | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| RNeasy Midi Kit | 75144 | Qiagen, Hilden, Deutschland |

3.1.8 Geräte und Software

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Geräte und Software mit Herstellerangaben.

| Gerät / Software | Artikelnummer / Version | Hersteller / Entwickler |
|------------------------------------|--------------------------------|---|
| Amersham Image Quant Software | 2.0.0 | Cytiva, Marlborough, USA |
| Amersham Imager | AF680 | Cytiva, Marlborough, USA |
| Excel | 2016 | Microsoft Corporation, Redmond, USA |
| FIJI | 1.53t | Schindelin <i>et al.</i> |
| GraphPad Prism | 9.5.0 | GraphPad Software Inc. |
| Konfokalmikroskop Leica TCS SP8 | TCS SP8 | Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland |
| Mini Gel Tank PAGE | A25977 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| PCR Cycler | MasterCycler Nexus Gradient | Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland |
| Plattenphotometer | FluoStar Omega | BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland |
| Plattenphotometer Software MARS | Version 4.01 R2 | BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland |
| Power Supply | PowerPac Basic | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA |
| Spektralphotometer | Nanodrop 2000 | Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland |
| Spektralphotometer Software | 1.5 | Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland |
| tick@lab Software | 3.0 Build 3269.3 | a-tune Software AG, Darmstadt, Deutschland |
| Tissue Ruptor | 9002756 | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Wasseraufreinigungssystem | Milli-Q reference | Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |

3.1.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit ddH₂O angesetzt. Der erforderliche pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH eingestellt.

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen in ihrer Zusammensetzung.

| Puffer / Lösung | Komponenten | Finale Konzentration |
|---|--|---|
| 1x TBS-T Puffer bei Raumtemperatur lagern | 20x TBS Tween-20 | 1x 0,1% (v/v) |
| 1x PBS-T Puffer bei Raumtemperatur lagern | 10x DPBS Tween-20 | 1x 0,1% (v/v) |
| 10x TAE Puffer pH 7,5 bei Raumtemperatur lagern | Tris EDTA Essigsäure | 400 mM 10 mM 20 mM |
| 20x TBS pH 7,5 bei Raumtemperatur lagern | Tris NaCl | 200 mM 2 M |
| 4% PFA-Lösung pH 7,2 steril filtrieren und bei -20°C dunkel lagern | 10x DPBS Paraformaldehyd | 1x 4% (w/v) |
| 5% Milchlösung vor Gebrauch frisch ansetzen | fettfreie Trockenmilch | 5% (w/v) in 1x TBS-T |
| Co-IP Extraktionspuffer vor Gebrauch frisch ansetzen | 5x IP Puffer (im Kit enthalten) NaCl DTT 100x Protease/Phosphatase Inhibitor | 1x 100 mM 1 mM 1x |
| EDTA-Puffer pH 7,8 steril filtrieren und bei 4°C lagern | NaCl KCl NaH ₂ PO ₄ HEPES Glukose Taurin EDTA | 130 mM 5 mM 0,5 mM 10 mM 10 mM 10 mM 5 mM |
| Kollagenase-Lösung | Kollagenase Typ 2 | 4200 U |

3. Material und Methoden

| | | |
|---|--|---|
| vor Gebrauch frisch ansetzen und steril filtrieren | Kollagenase Typ 4 Protease XIV | 5200 U 0,05 g/L in Perfusionspuffer |
| MACS-Puffer steril filtrieren und bei -20°C lagern | BSA EDTA | 0,5% (w/v) 2 mM in DPBS |
| Perfusionspuffer pH 7,8 steril filtrieren und bei 4°C lagern | NaCl KCl NaH ₂ PO ₄ HEPES Glukose Taurin MgCl ₂ | 130 mM 5 mM 0,5 mM 10 mM 10 mM 10 mM 1 mM |
| Ponceau-Färbelösung bei Raumtemperatur lagern | Essigsäure Ponceau S | 5% (v/v) 0,1% (w/v) |
| Stopp-Lösung vor Gebrauch frisch ansetzen | FBS | 5% (v/v) in Perfusionspuffer |
| Western Blot-Transferpuffer bei 4°C lagern | Tris Glyzin Methanol | 20% (v/v) |

3.2 Methoden

3.2.1 Tierhaltung

Die Zucht und Haltung der verwendeten Mäuse erfolgte in den Räumlichkeiten des Zentralen Tierlaboratoriums der Universitätsmedizin Essen. Die Tiere wurden in einer pathogenfreien Umgebung auf Holzspänen mit Möglichkeit zur Beschäftigung (Enrichment) in einer geeigneten Gruppengröße gehalten. Futter und Wasser stand zu jeder Zeit zur Verfügung. Das Raumklima wurde mit 19-21°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit konstant gehalten. Zudem bestand ein 12-stündiger Tages- und Nachtzyklus.

Experimente wurden an genetisch veränderten STAT2-defizienten (*Stat2*^{-/-}) Mäusen vor dem Hintergrund des 129S2/SvHsd Stamms und den entsprechenden Wildtypen (WT) durchgeführt. Organentnahmen zur Gewinnung von Zellen und Blutserum wurden zusätzlich an MIF-defizienten (*Mif*^{-/-}) Mäusen vor dem Balb/C-Hintergrund und WT Mäusen durchgeführt.

Es wurden Tiere beider Geschlechter im Alter von bis zu 24 Monaten verwendet.

Alle Experimente erfolgten nach Abstimmung mit den lokalen Behörden und den ortsansässigen Tierschutzbeauftragten (siehe Beantragung von Tierkontingenten zur Tötung gemäß §4 Tierschutzgesetz (TSchG) vom 14.02.2022).

3.2.2 *Mif*^{-/-} Zucht

Vor dem Balb/C Hintergrund wurde das *Mif*-Gen durch Insertion einer NeoR-Kassette disruptiert. Hierbei findet ein Verlust von Exon 2, Intron 2 und Exon 3 des *Mif*-Gens statt, wodurch keine mRNA oder Proteinprodukte mehr detektiert werden können. Im Vergleich zu WT Tieren weisen *Mif*^{-/-} Mäuse keine phänotypischen Besonderheiten auf. Die zur Zucht verwendeten Mäuse wurden ursprünglich von Jackson Laboratory erworben (Bar Harbor, USA).

Da die Zucht mit homozygoten Zuchtpaaren erfolgte und somit alle Nachkommen immer *Mif*-defizient sind, waren keine Genotypisierungen erforderlich, wurden jedoch in unregelmäßigen Abständen durchgeführt.

3.2.3 Isolation von kardialen Zellen

Um einzelne kardiale Zellpopulationen gezielt untersuchen zu können, mussten diese aus dem Herzen isoliert und voneinander getrennt werden. Das Verfahren zur Isolation verschiedener kardialer Zelltypen aus dem adulten Mausherzen beruhte auf der Methode von Ackers-Johnson *et al.* (71) und wurde im Labor etabliert und angepasst.

Vor Beginn des Versuchs wurden die Kammern eines 8-well-Kammerobjekträgers mit Laminin (1:100 v/v) für 1 h bei 37°C beschichtet.

Die Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet und auf einem Operationstisch fixiert. Nach Desinfektion des Thorax wurde dieser in Höhe des Sternums eröffnet. Durch longitudinale Schnitte in Richtung der Achseln wurden die Rippen durchtrennt. Das Brustbein konnte hierdurch nach oben geklappt werden, sodass das Herz frei lag.

Die *Vena cava* im Bauchraum wurde angeschnitten, um den Kreislauf des Tieres zu unterbrechen. Anschließend wurde eine 27G-Kanüle vorsichtig in den rechten Ventrikel des Herzens gestochen. Durch eine kontrollierte Injektion in den rechten Ventrikel mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Flussrate ~3 mL/min) wurde das Herz mit EDTA-Puffer (siehe Tab. 8) blutfrei gespült. Das Erblassen der Lungen und Leber wurde hierbei als Kontrolle hinzugezogen. Die Aorta wurde knapp oberhalb des Herzens mit einer Gefäßklemme verschlossen, das Herz aus dem Brustkorb entnommen und in eine Zellkulturschale mit 10 mL EDTA-Puffer überführt. Durch Injektion in den linken Ventrikel wurde das Herz für 6 min mit EDTA-Puffer perfundiert,

3. Material und Methoden

um verbleibende Blutreste vollständig zu entfernen. Zur Stabilisierung und Vermeidung von Gewebsverletzungen durch Verrutschen der Kanüle wurde diese mit Hilfe einer Löthilfe fixiert. Anschließend wurde das Herz in eine Schale mit 10 mL Perfusionspuffer überführt und für 2 min mit diesem perfundiert. Danach erfolgte ein Transfer in eine weitere Schale mit 10 mL Kollagenase-Lösung, wo das Gewebe für 20 min durch Infusion mit dieser verdaut wurde. Überschüssige Enzymlösung wurde aufgefangen und dem Kreislauf erneut zugeführt.

Nach Abschluss des Verdaus wurde das Gewebe in 3 mL Kollagenase-Lösung überführt und mit zwei Uhrmacherpinzetten vorsichtig in 1 x 1 mm große Stücke zerkleinert. Die Gewebelösung wurde für 2 min vorsichtig pipettiert, um einzelne Zellen aus dem Zellverband zu lösen. Die Kollagenase wurde durch Zugabe von 5 mL Stopp-Lösung und nochmaligem Resuspendieren für 2 min inaktiviert. Um Zellaggregationen zu verhindern, wurde die Zelllösung durch ein 100 µm-Zellsieb in ein 50 mL-Röhrchen filtriert und das Sieb mit 5 mL Stopp-Lösung gewaschen. Die Kardiomyozyten setzten sich aufgrund ihrer Größe innerhalb von 10 min am Boden des Röhrchens ab, Endothelzellen und Fibroblasten verblieben in der Lösung.

Um eine Hyperkontraktion der Kardiomyozyten aufgrund der erhöhten Kalziumkonzentration im Kulturmedium zu vermeiden, wurde diese schrittweise im Perfusionspuffer erhöht. Dazu wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Sediment in neuem Puffer mit erhöhter Kalziumkonzentration resuspendiert. Es wurden schrittweise drei Puffer mit steigender Konzentration von 0,34 mM über 0,68 mM zu 1,02 mM $[Ca^{2+}]$ verwendet. Anschließend wurden die Kardiomyozyten in 2 mL vorgewärmtem Medium aufgenommen und in den vorbereiteten 8-well-Kammerobjektträger (5.000 Zellen/well) ausgesät.

Die Endothelzellen und Fibroblasten im Überstand wurden bei 500 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und in 1 mL DPBS aufgenommen. Um für die weitere Aufreinigung störende kaputte Zellen zu entfernen, wurden 300 µL Zellschrottentferner hinzugeben. Das Gemisch wurde mit 1 mL DPBS überlagert, sodass sich zwei Phasen bildeten. Nach Zentrifugation bei 3000 g und 4°C für 10 min wurden die oberen beiden Phasen, die tote Zellen und Zelltrümmer enthielten, entfernt und das Sediment in 1 mL DPBS resuspendiert. Die Zellen wurden bei 1000 g und 4°C für 10 min resuspendiert und in 180 µL MACS-Puffer sowie 20 µL CD31-Mikrobeads aufgenommen. Um die Anheftung der Beads an Endothelzellen zu gewährleisten, wurde die Zelllösung für 15 min bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde 1 mL MACS-Puffer hinzugegeben und die Lösung bei 300 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Es wurde eine LS-Säule in einen Magneten eingespannt und mit 3 mL MACS-Puffer equilibriert. Das Zellsediment wurde in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert und über die Säule gegeben, die anschließend dreimal mit je 3 mL MACS-Puffer gewaschen wurde. Der Durchfluss mit CD31-negativen Zellen wurden dabei in einem 15 mL-Röhrchen aufgefangen. Danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und auf ein neues 15 mL-Röhrchen gesetzt. Durch

3. Material und Methoden

Zugabe von 5 mL MACS-Puffer und Nutzung des den Säulen beiliegenden Stempels wurden die Endothelzellen herausgewaschen. Beide Zelltypen wurden bei 500 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und in 1-2 mL des entsprechenden Mediums aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in 12-well-Zellkulturplatten (50.000 Zellen pro Vertiefung) oder 12-well-Kammerobjektträger (25.000 Zellen pro Vertiefung) ausgesät.

3.2.3 Kultivierung von Primärzellen

Die isolierten Kardiomyozyten wurden nach der Isolation für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden tote und beschädigte Zellen, die sich nicht am Boden des Objektträgers angeheftet hatten, entfernt und neues Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend direkt für Versuche verwendet.

Isolierte Endothelzellen wurden zunächst 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, da diese Zellen länger zur Anheftung an den Untergrund brauchten. Um ein vollständiges Anwachsen sowie eine Vermehrung der Zellen zu ermöglichen, wurden diese mindestens eine Woche (Ansatz im Kammerobjektträger) oder bis zur vollständigen Konfluenz (Ansatz in 12-well-Zellkulturplatte) kultiviert, das Medium wurde hierzu alle 2-3 Tage erneuert.

3.2.4 Humane Zellkultur

Um die Parthanatose nach CMV-Infektion auch im Menschen untersuchen zu können, wurden humane kardiale Zellen von Promocell verwendet. Hierbei handelt es um primäre isolierte Zellen aus dem rechten und linken Ventrikel (*human cardiomyocytes*, HCMs; *human cardiac fibroblasts*, HCFs) oder der Koronararterie (*human coronary endothelial cells*, HCAECs). Die Zellen eignen sich daher hervorragend für Untersuchungen in einem humanen System.

Zur Kultivierung der Zellen wurden zunächst 9 mL des entsprechenden Mediums in einer Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO₂ für 15 min erwärmt. Die gefrorenen Zellen wurden für 4 min bei 37°C erwärmt und anschließend direkt dem Medium zugeführt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und die Zellen bis mindestens zu 80% Konfluenz der Kulturflasche kultiviert. Anschließend wurden sie mit Hilfe des Zellablösungs-Kits von Zellkulturboden abgelöst. Nach Zentrifugation bei 500 g für 10 min wurden die Zellen in neuem Medium aufgenommen und entweder auf größere Kulturflaschen verteilt oder für weitere Versuche in der benötigten Zelldichte ausgesät.

3.2.5 Zellzählung

Um eine konstante Zelldichte innerhalb einer Versuchsreihe zu gewährleisten, musste die Anzahl der verwendeten Zellen im Vorfeld bestimmt werden. Hierzu wurden 20 µL der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und 20 µL Trypan Blau-Lösung hinzugegeben, um vitale von toten Zellen zu unterscheiden. 10 µL dieser Lösung wurden in eine für den jeweiligen Zelltyp geeignete Zählkammer überführt. Murine Endothelzellen und Fibroblasten sowie HCAECs und HCFs wurden in einer Neubauerkammer gezählt. Diese ist in 3x3 Großquadrate mit je 1 mm Kantenlänge unterteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden vier Großquadrate ausgezählt und aus dem bekannten Volumen die Zellkonzentration pro mL errechnet.

$$\text{Zellen / mL} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate} \times \text{Volumen eines Großquadrats}}$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = 2$$

$$\text{Anzahl der gezählten Quadrate} = 4$$

$$\text{Volumen eines Großquadrats} = 0,1 \mu\text{L}$$

Formel 1: Bestimmung der Zellkonzentration mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

Murine Kardiomyozyten und HCMs wurden aufgrund ihrer Größe in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt, die aufgrund ihres größeren Kammervolumens besser für größere Zellen geeignet ist. Die Kammer ist in 4x4 Gruppenquadrate mit je 1 mm Kantenlänge aufgeteilt. Es wurden fünf Gruppenquadrate ausgezählt und aus dem bekannten Volumen die Zellkonzentration pro mL errechnet.

$$\text{Zellen / mL} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000}{\text{Fläche der ausgezählten Gruppenquadrate} \times \text{Kammerhöhe}}$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = 2$$

$$\text{Fläche der ausgezählten Gruppenquadrate} = 5 \text{ mm}^2$$

$$\text{Kammerhöhe} = 0,2 \text{ mm}$$

Formel 2: Bestimmung der Zellkonzentration mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

3.2.6 Infektion von Mäusen

Um zu untersuchen, ob CMV in der Lage ist, Herzgewebe zu infiltrieren und dort zu replizieren, wurden *Stat2*^{-/-} sowie WT infiziert. *Stat2*^{-/-} Mäuse eignen sich aufgrund ihrer eingeschränkten Immunantwort hervorragend als Modell für immungeschwächte Patient*innen. Die Mäuse wurden mit 2*10⁵ PfU (*Plaque forming units*; funktionstüchtige Viruspartikel) mCMV infiziert, indem die Viruslösung intraperitoneal injiziert wurde. Kontrolltiere wurden mit dem

entsprechenden Volumen DPBS injiziert (Mock-Infektion). Die Mäuse wurden für bis zu 5 Tage nach Infektion (*5 days post infection*, d p.i.) engmaschig überwacht.

3.2.7 Infektion von Zellen

Zur Untersuchung der Parthanatose auf Zellebene wurden murine und humane Zellen mit mCMV bzw. hCMV infiziert. Um die Infektion einfach beobachten zu können, wurden fluoreszierende Virusstämme verwendet.

Humane Zellen in Kulturplatten wurden ausgesät und 24 h später mit EGFP-hCMV infiziert. Entsprechend der zuvor bestimmten Zellzahl wurde eine MOI (*multiplicity of infection*, entspricht der Anzahl an Viruspartikeln pro Zelle) von 1 (= ein Viruspartikel pro Zelle) errechnet. Das benötigte Volumen an Virus wurde dem neuem Kulturmedium zugegeben. Zur Verbesserung der Infektionsrate wurden die Zellen zweimal bei 800 g für jeweils 15 min zentrifugiert (*centrifugal enhancement*, (72)). Im Verlauf wurden die Zellen die ersten 12 Stunden lang zunächst alle 2 h, danach alle 24 h unter dem Lichtmikroskop begutachtet und der optimale Infektionszeitraum anhand Verlust der typischen Zellmorphologie (Abrunden der Zellen vom Plattenboden, Wachstumsstopp) bestimmt. Dieser lag für HCMs bei 48 h und für HCFs und HCAECs bei 5 Tagen. Humane Zellen in Kammerobjektträgern wurden für denselben Zeitraum infiziert, da die Objektträger jedoch nicht zentrifugiert werden können und so eine geringere Infektionsrate besteht, wurde hier eine MOI von 10 eingesetzt, um sicherzustellen, dass jede Zelle infiziert wurde.

Murine Zellen wurden in Kammerobjektträger ausgesät und nach ihrer Anheftung etwa eine Woche später mit EGFP- bzw. mCherry-mCMV mit einer MOI von 10 infiziert. Die Infektionsdauer wurde wie bereits für humane Zellen lichtmikroskopisch untersucht. Für Endothelzellen und Fibroblasten wurde eine optimale Infektionsdauer von 24 h festgelegt. Da die Kardiomyozyten nicht lange kultivierbar sind, konnte hier keine optimale Infektionsdauer bestimmt werden.

3.2.8 Serumgewinnung aus Mäusen

Um Serumanalysen durchführen zu können, wurden aus infizierten sowie unbehandelten (naiven) *Stat2*^{-/-} und WT Mäusen Blut entnommen. Das Blut wurde bei den infizierten Tieren drei bis vier Tage nach Infektion durch die AG Trilling entnommen. Ebenso wurden unbehandelte (naive) *Mif*^{-/-} und Balb/C Mäuse als Kontrolle herangezogen.

Zu Beginn wurden vier bis fünf Koagulationskugeln aus einer Serummonovette entnommen und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation oder

CO₂-Begasung getötet und auf einem Kleintieroperationstisch fixiert. Thorax und Abdomen wurden mit 70% Ethanol (v/v) desinfiziert und mit einer Schere geöffnet. Die Beckenarterie (*Arteria iliaca communis*) wurde in Höhe der Nieren identifiziert. Eine 1 mL-Insulinspritze wurde mit einer 23G-Kanüle versehen und in einem möglichst flachen Winkel in das Gefäß eingeführt, um ein versehentliches Durchstechen der Arterie und den somit einhergehenden Blutverlust zu verhindern. Durch langsames Aufziehen der Spritze wurde möglichst viel Blut entnommen.

Das Blut wurde in die vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Koagulation zu ermöglichen. Anschließend wurde das Blut bei 4000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die festen Blutbestandteile sammelten sich so am Grund des Gefäßes. Das Serum im Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde es bei -80°C gelagert.

3.2.9 Bestimmung der Viruskonzentration im Gewebe

Stat2^{-/-} und WT Mäuse wurden wie oben beschrieben mit mCMV infiziert und über fünf Tage lang täglich beobachtet, um den Krankheitsverlauf zu dokumentieren. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und der Brustkorb wie schon zuvor beschrieben geöffnet, um das Herz freizulegen. Die *Vena cava* wurde durchtrennt, um den Kreislauf des Tieres zu unterbrechen. Das Herz wurde mit Heparin zugesetztem DPBS (finale Konzentration: 40 I.E./mL) und unter Nutzung einer Schlauchpumpe (Flussrate 5,68 mL/min) für einige Minuten blutfrei gespült. Die folgenden Schritte wurden in Kooperation durch die AG Trilling durchgeführt.

Anschließend wurde das Herz aus dem Brustkorb entnommen, gewogen und kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle übrigen Organe wurden ebenfalls auf diese Art entnommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebe bei -80°C gelagert.

Für die Titration wurden im Vorfeld primäre embryonale Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) oder neugeborene Mauszellen (*mouse newborn cells*, MNCs) in 48-well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz in MEF-Kulturmedium kultiviert.

Um das Gewebe aufzuschließen, wurden die Organe mit dem Stempel einer sterilen Spritze durch jeweils ein 40 µm-Zellsieb in ein 50 mL-Röhrchen gedrückt. Das Sieb wurde fünfmal mit je 1 mL 5% FBS (v/v) in DPBS gewaschen und der Durchfluss sowie im Sieb verbliebene Gewebereste in das Röhrchen transferiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 800 g und 4°C wurde der Überstand in ein neues 15 mL-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert, während das verbrauchte MEF-Kulturmedium von den MEFs oder MNCs abgenommen und durch 500 µL neues Medium pro Vertiefung der Kulturplatte ersetzt wurde. Die Organlösung

3. Material und Methoden

wurde noch einmal für 5 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert und 50 µL des Überstands in eine Vertiefung mit MEFs oder MNCs gegeben. Von dort aus wurden sechs Verdünnungsschritte angelegt, indem 55 µL der vorigen Vertiefung mit den bereits vorhandenen 500 µL Medium vermischt wurden. Daraus wurde anschließend die nächste Verdünnung erstellt. Von jedem Verdünnungsschritt wurden vier Replikate angefertigt. Die Platten wurden danach zweimal für 15 min bei 800 g zentrifugiert und für 1 h für Leberproben und 2 h für alle anderen Organe bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 500 µL 0,6% (m/v) Methylzellulose in Kulturmedium überschichtet, damit sich eine mögliche Infektion einzelner Zellen nur auf direkt angrenzende Zellen und nicht über das Medium ausbreiten konnte. Die Zellen wurden für vier Tage bei 37°C inkubiert und die entstandenen Plaques unter dem Mikroskop ausgezählt. Der mCMV-Titer wurde anschließend als PfU pro g Gewebe kalkuliert.

3.2.10 PCR

Um die CMV-Replikation im Gewebe nachzuweisen, wurde die RNA aller aktiv zu synthetisierenden Proteine im Herzen isoliert, in DNA transkribiert und mittels PCR und speziell gegen virale DNA-Fragmente gerichtete Primer multipliziert. Die so entstandenen Genprodukte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Zur Untersuchung der Virusreplikation im Gewebe wurden *Stat2*^{-/-} und WT Mäuse mit mCMV infiziert und die Herzen wie bereits unter 3.2.9 beschrieben blutfrei gespült. Danach wurden die Herzen in 2 mL RNA Protect Tissue Reagent überführt, um den Abbau der RNA im Gewebe zu verhindern. Zur besseren Perfusion des Gewebes mit der Lösung wurde es mit einer feinen Schere zerkleinert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy midi Kit von Qiagen verwendet. Alle hierzu verwendeten Puffer waren im Kit enthalten. Die Herzen wurden in 4 mL RLT-Puffer mit 0,04 M DTT unter Verwendung des Tissue Ruptors mechanisch für 45 s homogenisiert. Die Lösung wurde bei 3000 g für 10 min zentrifugiert, um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen transferiert und mit dem gleichen Volumen an 70% Ethanol versehen. Durch kräftiges Schütteln der Lösung präzipitierte die RNA und wurde anschließend in mehreren Schritten auf eine RNeasy Midi Säule gegeben. Zwischen den einzelnen Auftragungsschritten sowie anschließend wurde die Säule für 10 min bei 3000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgte ein Waschschrift mit 4 mL RW1-Puffer und zweimal mit je 2,5 mL RPE-Puffer. Dazwischen sowie anschließend wurde für 5 min bei 3000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um restlichen Waschpuffer zu entfernen, wurde die Säule noch einmal bei 3000 g für 5 min trocken zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Röhrchen gestellt und 200 µL RNase freies Wasser direkt auf die Membran in der Säule gegeben, um die RNA zu eluieren. Nach einer Inkubation von 1 min wurde die Säule für

3. Material und Methoden

3 min bei 3000 g zentrifugiert und das Eluat aufgefangen. Diese beiden Schritte wurden noch einmal wiederholt, um alle RNA aus der Säule zu gewinnen.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA für die weitere Prozessierung erfolgte mit Hilfe des NanoDrop-Messgeräts. Zunächst wurden 1,5 µL ddH₂O für die Hintergrundmessung gemessen. Anschließend erfolgte die Messung von 1,5 µL der RNA-Lösung. Als Qualitätssicherung wurde das Verhältnis der Werte der optischen Dichte (OD-Werte) bei 260 zu 280 nm Wellenlänge herangezogen. Für RNA liegt dieses Verhältnis bei 1,9 bis 2,1.

Für die Umschreibung von RNA in DNA wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Um eventuell vorhandene Spuren von DNA zu eliminieren, wurde das für 1 µg benötigte Volumen RNA an RNA-Lösung mit 2 µL vorgefertigtem 7x gDNA wipeout Puffer versetzt und die Lösung mit ddH₂O auf 14 µL aufgefüllt. Die reverse Transkription erfolgte anschließend in folgendem Ansatz:

- 1 µL QuantiTect Reverse Transcriptase
- 4 µL 5x RT Puffer
- 1 µL RT Primer Mix
- 14 µL des vorbereiteten RNA-Ansatzes

Das Gemisch wurde für 15 min bei 42°C inkubiert, um die reverse Transkription zu ermöglichen. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 95°C für 3 min gestoppt.

Die Amplifikation der somit transkribierten DNA erfolgte nach dem folgenden Ansatz:

- 12,5 µL 2x AccuStart™ II GelTrack PCR SuperMix
- 150 nM Forward Primer
- 150 nM Reverse Primer
- ddH₂O zum Auffüllen auf 25 µL Gesamtvolumen
- 5 µL transkribierte DNA

Der AccuStart™ II GelTrack PCR SuperMix ist ein fertiges Gemisch für Amplifikationen von DNA-Segmenten und enthält bereits einen Farbstoff für das spätere Auftragen der Proben auf ein Gel, eine Taq Polymerase und die dafür benötigten Komponenten (3 mM MgCl₂ und je 0,4 mM Nukleinbasen). Die PCR wurde mit Hilfe des MasterCyclers von Eppendorf nach folgendem Schema durchgeführt:

| | | |
|----------------|----------------------------|-------|
| 10 min 95°C | Polymerase-Aktivierung | |
| 15 s 95°C | Denaturation der DNA | } 40x |
| 1 min 60 °C | Hybridisierung | |
| 1 min 70 °C | Amplifizierung | |
| 5 min 70°C | finale Amplifizierung | |
| Halten auf 4°C | Reaktionsende und Lagerung | |

Die amplifizierte DNA wurde in einem Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, um die Fragmentgröße zu untersuchen. Die DNA-Stücke werden dabei in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden 2 g Agarose mit 100 mL 1x TAE-Puffer und 20 µL GelRed-Farbstoff vermischt und für 90 s in einer Mikrowelle erhitzt, um die Agarose zu lösen. 30 mL Lösung wurde auf ein zuvor mit 70% Ethanol gereinigte Glasplatte gegossen, auf der ein 20-well Kamm aufgebracht war. Das Gel erstarrte innerhalb von 20 min bei Raumtemperatur. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Kammer gelegt. Jeweils 7 µL der Proben und eines Referenzmarkers (E-Gel™ 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) wurden aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V für 50 min durchgeführt. Das Gel wurde von der Platte gelöst und unter UV-Licht im Amersham Imager dokumentiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend anhand ihrer Größe interpretiert.

3.2.11 Troponin-Bestimmung

Der Nachweis von kardialen Troponin I wird auch im klinischen Alltag zur Untersuchung einer Herzschiädigung herangezogen, da es sich im Gegensatz zu Troponin aus den Skelettmuskeln um die ausschließlich im Herzen vorkommende Variante handelt, die nur von bereits untergehenden Kardiomyozyten freigesetzt wird.

Zur Bestimmung der Troponin-Konzentration wurde das cardiac Troponin I ELISA Kit von Life Diagnostics verwendet. Hierzu wurden die zuvor generierten Serumproben auf eine mit gegen Troponin I gerichteten Antikörper beschichtete 96-well-Platte aufgetragen. Der im Kit enthaltene Standard wurde entsprechend der Anleitung gelöst und als Verdünnungsreihe ebenfalls aufgetragen. Da die Proteinkonzentration im Blutserum sehr hoch ist und ggf. den Standard übersteigen würde, wurden die Proben zuvor im Verhältnis 1:20 mit der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung verdünnt. Nach zweistündiger Inkubation zur Bindung an den Antikörper wurde die Platte mit der mitgelieferten Waschlösung gewaschen und für 1 h mit HRP-Konjugat inkubiert, gefolgt von erneutem Waschen. Die Platte wurde für 25 min dunkel mit TMB-Substrat inkubiert, wodurch sich die Proben blau färbten. Durch Zugabe von

Stopplösung erfolgte ein Farbumschlag zu gelb. Die Proben wurden in einem Plattenphotometer innerhalb von 5 min bei 450 nm Anregungswellenlänge gemessen.

Um zu untersuchen, ob durch die genetische Deletion von STAT2 oder MIF bereits eine Herzmuskeldestruktion stattfindet, wurde die Troponinkonzentration im Blut nicht infizierter Tiere bestimmt. WT Tiere dienten als Vergleich. Die untere Detektionsgrenze des ELISA Kits betrug 0,039 ng/mL, die obere 2,5 ng/mL. Es konnte in allen Proben kein kardiales Troponin I gemessen werden (Abb. 3).

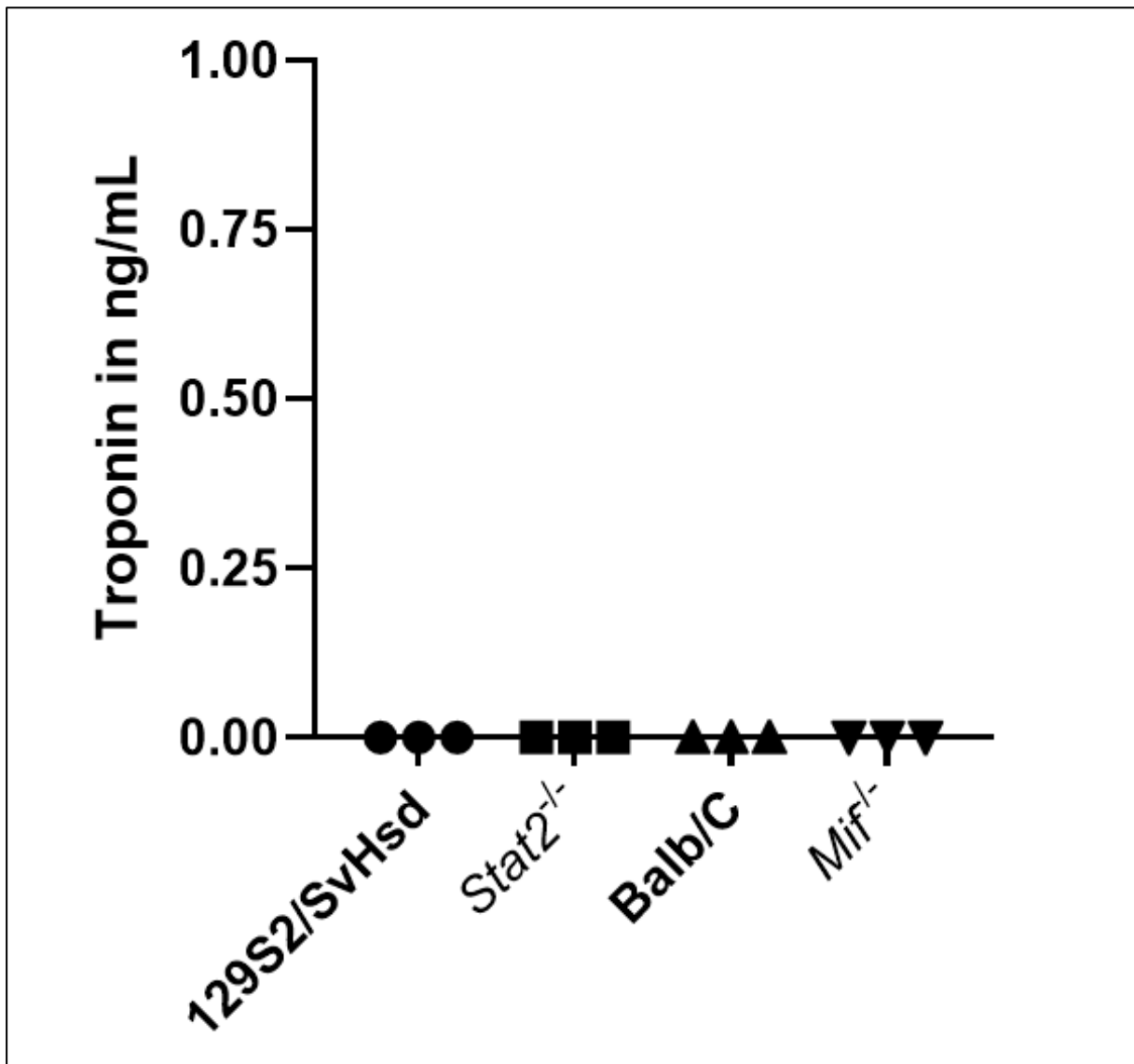


Abb. 3: Bestimmung der kardialen Troponin I-Konzentration im Blutserum der verwendeten Mauslinien.

Blutserum wurde aus unbehandelten (naiven) Mäusen gewonnen. Mit Hilfe eines ELISAs gegen kardiales Troponin I wurde die Konzentration an Troponin in ng/mL Serum bestimmt. n=3, Mittelwert und Standardabweichung.

In unbehandelten Tieren konnte kein Troponin gemessen werden. Die Tiere weisen somit aufgrund ihres genetischen Hintergrunds keine Herzschädigung mit Untergang von Kardiomyozyten auf.

3.2.12 Immunfluoreszenzfärbung

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung können Proteine oder Zellstrukturen spezifisch mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper oder einem fluoreszierenden Farbstoff innerhalb der Zelle detektiert und lokalisiert werden.

Hierfür wurde das Medium der kultivierten oder infizierten Zellen abgenommen und die Zellen für 20 min in 4% PFA-Lösung fixiert. Die Zellen wurden gewaschen, indem die Fixierlösung entfernt und durch PBS ersetzt wurde. Dieser Waschschrift wurde nach 10 min wiederholt. Die Zellen wurden mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert und anschließend zweimal wie oben beschrieben mit PBS-T gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 1 h in 5% (m/v) BSA in PBS-T inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem in 1% (m/v) BSA in PBS-T gelösten Primärantikörper (siehe Tab. 5) über Nacht bei 4°C sowie dreimaliges Waschen mit PBS-T für je 10 min. Die Zellen wurden anschließend mit dem entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tab. 5) im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Nach Inkubation und erneutem Waschen wurden die Zellen für 15 min mit DAPI-Lösung (1:4000) im Dunkeln inkubiert, um die Zellkerne sichtbar zu machen. DAPI lagert sich an die DNA an und emittiert bei Anregung unter dem Konfokalmikroskop ein Fluoreszenzsignal bei einem Emissionsmaximum von 461 nm. Der Zellkern kann somit innerhalb der Zelle identifiziert werden. Die Zellen wurden erneut gewaschen, um die restliche Färbelösung zu entfernen und die Kammern des Objektträgers entfernt. Anschließend wurden einige Tropfen des Eindeckmittels Prolong Gold Antifade auf die Zellen gegeben, um die Fluoreszenz zu konservieren. Ein Deckglas wurde aufgelegt, um eine Austrocknung der Proben zu vermeiden.

Die Auswertung erfolgte mit dem Leica SP8 gSTED Super Resolution Konfokalmikroskop.

3.2.13 Proximity Ligation Assay

Um die Interaktion von MIF und AIF im Rahmen der Parthanatose zu untersuchen, wurde ein Proximity Ligation Assay durchgeführt. Hiermit kann die Interaktion zweier Proteine über ihre räumliche Nähe zueinander mit Hilfe eines Fluoreszenzsignals visualisiert werden. Es wurde das Duolink® In Situ Rot Starterkit von Sigma-Aldrich verwendet. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.12 fixiert und über Nacht mit den Primärantikörpern der zu untersuchenden Proteine inkubiert (siehe Tab. 5). Da die Sekundärantikörper aus dem Kit gegen Kaninchen-

und Maus-Antikörper gerichtet sind, wurden Primärantikörper ausgewählt, die aus je einer der beiden Spezies stammen.

Die Sekundärantikörper sind an Oligonukleotide gekoppelt, die bei einer räumlichen Distanz von bis zu 40 nm und durch Zugabe von Ligase eine Ringstruktur bilden. Die Proben wurden zuerst für 1 h mit den Sekundärantikörpern bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer A für zweimal je 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit der vorbereiteten Ligase bei 37°C inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschläufe mit Waschpuffer A. Durch Zugabe einer Polymerase und der Inkubation für 100 min bei 37°C wird die zuvor gebildete Ringstruktur amplifiziert. Fluorophor-gekoppelte Oligonukleotide hybridisieren anschließend mit komplementären Strukturen in der amplifizierten DNA, sodass nach Anregung Licht im roten Wellenlängenbereich emittiert wird.

Die Proben wurden nach der Hybridisierungsreaktion noch zweimal mit Waschpuffer A gewaschen und wie bereits zuvor beschrieben mit DAPI gefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Proben noch einmal mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer B gewaschen, mit dem bereits zuvor verwendeten Eindeckmedium konserviert und mit einem Deckglas verschlossen.

Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit dem Leica SP8 gSTED Super Resolution Konfokal-Mikroskop.

3.2.14 Co-Immunpräzipitation

Um die Interaktion von MIF und AIF auch durch direkte Proteinbindung zu verifizieren, wurde eine Co-Immunpräzipitation mit dem Dynabeads Co-IP Kit von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Das zu untersuchende Protein, hier AIF, wird durch an magnetische Kugeln (Beads) kovalent gebundenen Antikörper immobilisiert. Das Zielprotein wird dabei mitsamt aller nativen Bindungspartner präzipitiert, wobei die Proteinkomplexe intakt bleiben. Das Präzipitat kann anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot weiter analysiert werden, um die Interaktionspartner zu identifizieren.

Zuvor wurde ein gegen AIF gerichteter Antikörper (siehe Tab. 5) an die Dynabeads gebunden. Hierfür wurden 1,5 mg Beads in 1,5 mL-Reaktionsgefäße abgewogen und mit 1 mL des im Kit enthaltenen C1-Puffers gewaschen. Die Reaktionsgefäße wurden in einem magnetischen Ständer platziert, um die Beads am Boden des Gefäßes zu sammeln und so den Überstand leichter abnehmen zu können. Auf diese Weise wurden alle weiteren Schritte zum Wechseln oder Entfernen von Lösungen durchgeführt.

50 µL Antikörper wurden in 25 µL C1-Puffer und 75 µL C2-Puffer gelöst (finale Konzentration: 10 µg) und die Beads darin resuspendiert. Um eine Bindung des Antikörpers an die Beads zu

3. Material und Methoden

ermöglichen, wurde das Gemisch über Nacht bei 37°C auf einem Rotationsrad inkubiert. Die im Kit enthaltenen Puffer HB und LB wurden mit 0,1% (v/v) Tween20 versehen. Die Beads wurden je einmal mit 800 µL vorbereitetem HB- bzw. LB-Puffer gewaschen sowie zweimal in SB-Puffer, gefolgt von einer Inkubation in 800 µL SB-Puffer für 15 min auf einem Rotationsrad. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die somit gekoppelten Beads in 100 µL SB-Puffer bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Die für die Co-IP benötigten Zellen wurden auf jeweils vier 6-well-Zellkulturplatten ausgesät und bis etwa 80% Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden je zwei Platten wie oben beschrieben mit hCMV infiziert. Der Extraktionspuffer wurde am Tag des Versuchs frisch angesetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgeschabt und mitsamt des Kulturmediums in ein zuvor gewogenes 15 mL-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 500 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 5 mL DPBS aufgenommen und erneut zentrifugiert, um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Röhrchen erneut gewogen und so das Gewicht des Zellsediments bestimmt. Die Zellen wurden anhand ihres Gewichts im Verhältnis 1:9 (m/v) mit Extraktionspuffer verdünnt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2600 g und 4°C für 5 min zentrifugiert, um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen. Das Proteinlysate im Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt.

Der im Kit enthaltene LWB-Puffer wurde mit 0,02% (v/v) Tween20 versehen. Die gekoppelten Beads wurden mit 900 µL Extraktionspuffer gewaschen und für 30 min bei 4°C auf einem Rotationsrad mit dem Proteinlysate inkubiert. Darauffolgend wurden die Beads dreimal mit je 900 µL Extraktionspuffer gewaschen, in je 200 µL vorbereitetem LWB-Puffer aufgenommen und für 5 min auf einem Rotationsrad inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads in 60 µL EB-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min auf dem Rotationsrad wurde der Überstand mit den eluierten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Eluat wurde entweder sofort weiterprozessiert oder bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

3.2.15 LDS-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der LDS-Gelelektrophorese sollten die zuvor isolierten Bindungspartner von AIF anhand ihrer molekularen Masse identifiziert werden. Hierbei wandern die Proteine in einem elektrischen Feld durch das Gel und werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse getrennt. Es wurden vorbereitete 4-12% Bis-Tris-Gele von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit Sample Reducing Agent und 1:10 mit LDS Sample Buffer versetzt. Das Lithiumdodecylsulfat (LDS) im Probenpuffer bezweckt, dass die Proteine denaturieren und die Eigenladung der Proteine verdeckt wird, sodass sie ausschließlich nach

ihrer Masse aufgetrennt werden können. Ein kurzes Erhitzen von 5 min auf 95 °C zerstörte die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine.

Die Laufkammer des Gels wurde mit 200 mL 1x Laufpuffer (Bolt™ MES SDS Running Buffer) gefüllt. Der sich im Gel befindende Plastikkamm wurde entfernt und die Taschen durch vorsichtiges Pipettieren mit Laufpuffer gespült. Die Taschen wurden mit je 60 µL der Proben bzw. 5 µL SeeBlue-Marker zur Bestimmung der Laufhöhe beladen. Die Elektrophorese wurde mit dem Novex Bolt Gel Elektrophorese System durchgeführt, bei der die Proben mit einer konstanten Spannung von 200 V für 25 min aufgetrennt werden. Die Proteine durchliefen das Gel dabei vom Minus- zum Pluspol und wurden aufgrund der Molekularsiebeigenschaften des Gels getrennt.

3.2.16 Western Blot

Die Proteine wurden anschließend direkt in ihrer Größenposition im Gel auf eine Membran transferiert, von der aus sie anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert werden konnten.

Hierzu wurden die Gele aus ihrer Plastikhalterung gelöst und kurz in Transferpuffer equilibriert. Im Rahmen des Nasstransfers wurde das Schichtsystem für die Transferkammer folgendermaßen zusammengesetzt: schwarzer Boden der Transferhalterung, Schwamm, Filterpapier, SDS-Gel, PVDF-Transfermembran, Filterpapier, Schwamm und zuletzt der rote Boden der Transferhalterung. Dieser Aufbau wurde entsprechend der Farbcodierung (rote Seite der Halterung in Richtung der roten Elektrode der Transferkammer) in eine Transferkammer gesteckt, die wiederum mit Transferpuffer befüllt wurde. Der Transfer wurde über Nacht bei 4°C bei einer konstanten Stromstärke von 110 mA durchgeführt. Der Erfolg des Transfers wurde über eine reversible Ponceau-Färbung aller Proteine auf der Membran überprüft. Die Membran wurde hierfür in eine Schale mit Ponceau-Färbelösung transferiert und für 15 min unter Schwenken inkubiert. Überschüssige Färbelösung wurde anschließend durch mehrere Waschschrte mit ddH₂O entfernt und die Membran im Amersham Imager dokumentiert.

Für die Proteindetektion mittels Antikörpermarkierung wurde die Membran zunächst für 10 min unter Schwenken in TBS-T inkubiert, um die restliche Ponceau-Lösung zu entfernen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h unter Schwenken in 5% (m/v) fettfreie Trockenmilch in TBS-T inkubiert. Die Bindung der Primärantikörper an die Zielproteine MIF und AIF (siehe Tab. 5) erfolgte über Nacht bei 4°C unter Schwenken, um eine gleichmäßige Bindung der Antikörper über die Gesamtfläche der Membran zu gewährleisten. Nicht gebundene Antikörper wurden am nächsten Tag durch drei Waschschrte zu je 10 min

mit TBS-T entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Veriblot Detektionsreagenz für 1 h unter Schwenken. Das Reagenz ist an das Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gebunden, welches in Kombination mit einer Detektorlösung ein Chemolumineszenzsignal erzeugt. Zusätzlich findet nur eine Bindung an intakte Antikörper statt. Etwaige Restmengen Antikörper aus der Co-IP zerfallen durch das Denaturieren der Probe bei der Probenaufbereitung für die LDS-Gelelektrophorese und werden nicht erfasst. Nach der Bindung wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die Membran für 1 min mit der Belichtungslösung SuperSignal™ West Femto inkubiert. Die mit dem Antikörper konjugierte Peroxidase katalysierte Chemolumineszenzreaktion wurde mit dem Amersham Imager aufgezeichnet.

3.2.17 Quantifizierung des Zellschadens

Die bei der Parthanatose ausgelöste DNA-Fragmentierung durch MIF resultiert in DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese lassen sich mittels Immunfluoreszenzfärbung quantifizieren. Die Phosphorylierung des Histons H2A.X ist spezifisch für DNA-Doppelstrangbrüche, da dies normalerweise die zelleigenen Reparaturmechanismen in Gang setzt. Im Rahmen der Parthanatose kann hier jedoch die Phosphorylierung von H2A.X als Marker für den Schaden an der Zelle angesehen werden.

Phosphoryliertes Histon H2A.X (γ H2A.X) wurde wie in Abschnitt 3.2.12 beschrieben mittels Immunfluoreszenzfärbung in infizierten sowie mock infizierten kardialen Zellen detektiert. Es wurden kardiale Endothelzellen und Fibroblasten aus 129S2/SvHsd, *Stat2*^{-/-}, Balb/C und *Mif*^{-/-} Mäusen miteinander verglichen. Hierzu wurde das Cell Counter Plugin des Programms Fiji genutzt. Alle Bilder wurden mit der gleichen Belichtungsintensität aufgenommen. Durch die Eigenfluoreszenz von mCMV konnte zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen unterschieden werden. Zellkerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht, um ggf. Färbeartefakte außerhalb des Zellkerns auszuschließen. Zellkerne, die ein Signal für γ H2A.X zeigten, wurden als positiv für DNA-Schaden durch Parthanatose gewertet. Innerhalb der nicht infizierten Zellpopulation wurde in zwei Gruppen (DNA-Schaden positiv oder negativ) unterschieden. Da in der Population der infizierten Zellen teilweise auch nicht infizierte Zellen vorkommen, jedoch nicht auszuschließen ist, dass diese durch Zell-Zell-Interaktionen ebenfalls in ihrer Funktion beeinträchtigt sind, wurde hier in vier Gruppen unterschieden: infizierte Zellen mit oder ohne DNA-Schaden sowie benachbarte (nicht infizierte) Zellen mit oder ohne DNA-Schaden.

3.2.18 Statistik

Statistische Signifikanz wurde ausschließlich bei der Quantifizierung des Zellschadens untersucht. Vor Berechnung der Signifikanz wurden die Werte mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde die Signifikanz mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (*analysis of variance*; ANOVA) geprüft. Bei gegebener Signifikanz erfolgte der paarweise Vergleich (post hoc-Test) durch das Testverfahren nach Bonferroni. Alle Berechnungen wurden mit Graph Pad Prism Version 9.5.0 getätigt.

4. Ergebnisse

4.1 Cytomegalovirus infiziert Herzgewebe

4.1.1 Cytomegalovirus infiltriert kardiales Gewebe immunsupprimierter Mäuse

Eine hCMV-Infektion stellt vor allem für immunsupprimierte Patient*innen ein Risiko dar. Da die Untersuchung im menschlichen Gewebe aufgrund der Notwendigkeit einer Biopsie schwierig ist und hCMV streng wirtsspezifisch ist, musste ein geeignetes Mausmodell etabliert werden. Hierzu wurden STAT2-defiziente Mäuse mit mCMV infiziert, da diese durch die genetische Deletion über eine eingeschränkte antivirale Immunantwort verfügen. Die Tiere wurden mit der standardmäßigen Dosis von $2 \cdot 10^5$ PfU pro Maus infiziert und zeigten bereits nach wenigen Tagen Krankheitssymptome. Aus Vorversuchen der AG Trilling ist bekannt, dass die Mäuse unbehandelt rund eine Woche nach Infektion versterben (64). Es wurde daher ein Untersuchungszeitpunkt von fünf Tagen nach Infektion (*5 days post infection*, d p.i.) gewählt. WT Tiere zeigten keine Anzeichen. Zu den Krankheitssymptomen zählten eine geringe Körpertemperatur, Apathie und Gewichtsverlust. Es handelte sich hierbei um mögliche Anzeichen für eine Myokarditis, die Symptome waren jedoch nicht spezifisch. Um CMV im Herzgewebe nachzuweisen, wurde das Herz infizierter *Stat2*^{-/-} und entsprechender WT Tiere blutfrei gespült und die Zellen durch Homogenisierung aufgeschlossen, um funktionstüchtige Viruspartikel freizusetzen. Der Überstand wurde in Verdünnungsschritten auf einen Zellrasen gegeben, um den Virustiter pro Gramm Gewebe zu bestimmen. Es wurden verschiedene Organe titriert, um den Erfolg des Versuches zu kontrollieren und Vergleichswerte zu erhalten. Der Spülvorgang des Herzens ging mit einem Blutverlust der Maus einher, im Gegensatz zum Herzen waren alle anderen Organe jedoch nicht blutfrei. Daher wurden insbesondere in den stark durchbluteten Organen wie Milz und Leber natürlicherweise höhere Virustiter erwartet.

5 d p.i. konnte in den *Stat2*^{-/-} Mäusen in allen Organen mCMV nachgewiesen werden. Am höchsten war der Virustiter in der Milz. Das Herzlysate einer Maus lag mit 10 pfU pro Gramm Gewebe unter der Detektionsgrenze des Plaque Assays, alle anderen deutlich darüber. Auch in Leber und Speicheldrüsen wurde mCMV nachgewiesen. In WT Tieren wurden insgesamt niedrigere Virustiter gemessen, diese lagen im Herzen unter der Detektionsgrenze und in den Speicheldrüsen knapp darüber. Deutlich höhere Titer wurden in der Milz bestimmt (Abb. 4).

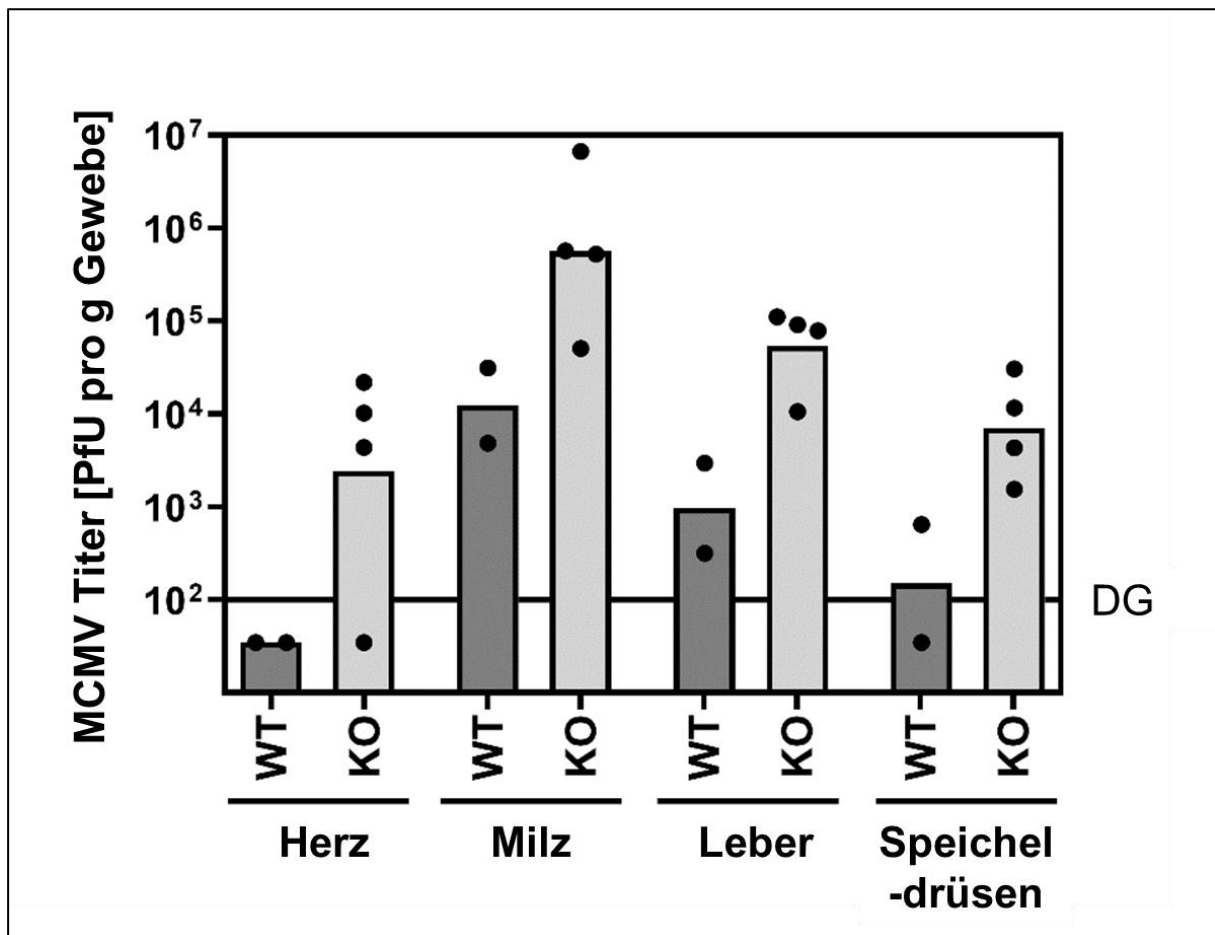


Abb. 4: Bestimmung des mCMV Titers in *Stat2*^{-/-} (KO) und WT Mäusen.

Stat2^{-/-} (KO) und entsprechende WT Mäuse wurden mit $2 \cdot 10^5$ PfU pro Maus infiziert. 5 d p.i. wurde das Herzgewebe blutfrei gespült und zusätzlich Milz, Leber und Speicheldrüsen entnommen. Virustiter wurde aus Organlysaten mittels Plaque Assay bestimmt. DG = Detektionsgrenze. WT n=2; KO n=4.

Erwartungsgemäß wurden in Milz und Leber höhere Virustiter gemessen als im Herzen. Auch in den Speicheldrüsen wurden höhere Titer bestimmt, da der verwendete mCMV-Stamm gut in Speicheldrüsen repliziert (64). Da das Herz als einziges Organ blutfrei gespült wurde, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass mCMV im Gewebe und nicht im Blut vorhanden ist. MCMV infiltriert also in immunsupprimierten Mäusen das Herzgewebe. In WT Mäusen findet eine Infiltration in andere Organe statt, im Herzen ist dies jedoch nicht eindeutig nachweisbar. Ob es bei der Infiltration auch zu aktiver Replikation kommt, ist unklar.

4.1.2 Cytomegalovirus repliziert im Herzgewebe

Die Ergebnisse der Organlysate-Untersuchungen nähren die Vermutung, dass mCMV mit hoher Wahrscheinlichkeit im Herzgewebe immunsupprimierter Mäuse zu finden ist. Es ist allerdings noch unklar, ob mCMV im extrazellulären Raum zu finden ist oder in die Zellen eindringt und den Replikationszyklus startet. Es ist bekannt, dass hCMV in Endothelzellen eine lytische

Infektion durchläuft (14). Dies ist auch für Fibroblasten und Kardiomyozyten möglich (73). Um zu untersuchen, ob mCMV im kardialen Gewebe den Replikationszyklus beginnt, wurde aus dem blutfrei gespülten Herzgewebe infizierter *Stat2*^{-/-} Mäuse und mock infizierter Kontrolltiere die mRNA extrahiert. Bereits in RNA transkribierte Virus-DNA wurde hierbei ebenfalls gewonnen. Zur Kontrolle wurde auch mRNA aus der Leber isoliert, da der gemessene Virustiter im vorherigen Versuch höher war als im Herzen. Die RNA wurde mittels reverser Transkription zurück in DNA überschrieben und eine PCR mit gegen das *Immediate early protein 1 (ie-1)* gerichteten Primern durchgeführt. Falls zum untersuchten Zeitpunkt von 5 d p.i. mCMV die Replikation begonnen hat, wird die entsprechende *ie-1*-DNA mittels PCR vervielfältigt und kann anschließend im Agarose-Gel unter UV-Licht detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde auch ein PCR-Ansatz mit kompletter mCMV-DNA durchgeführt. Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte ihrer Länge nach aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht dokumentiert. Es konnte *ie-1* im Herzen infizierter Tiere auf einer Höhe von knapp unter 200 Basenpaaren (*base pairs*, bp) nachgewiesen werden. In der Leber war das Signal noch etwas stärker. Auch in der Positivkontrolle mit mCMV-DNA konnte *ie-1* detektiert werden. In den mock infizierten Kontrolltieren war hingegen kein Signal zu erkennen (Abb. 5).

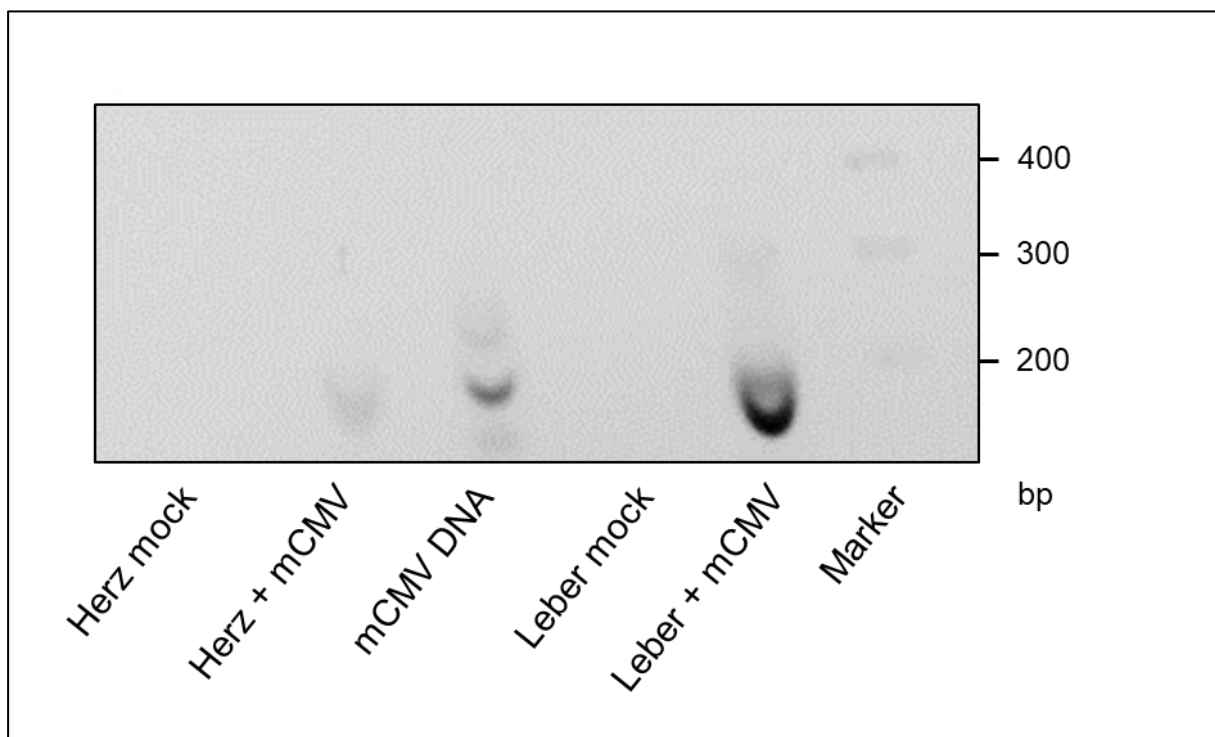


Abb. 5: Nachweis der mCMV-Replikation infizierter *Stat2*^{-/-} Mäuse vs. Kontrolltiere 5 d p.i.

Stat2^{-/-} Mäuse wurden mit mCMV infiziert und das Herz 5 d p.i. blutfrei gespült. Herz und Leber wurden entnommen und die mRNA aus dem Gewebe isoliert. Nach reverser Transkription wurde eine PCR des *ie-1*-Gens durchgeführt und die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. mCMV DNA dient als Positivkontrolle, Proben aus mock infizierten Tieren als Negativkontrolle.

Es konnte *ie-1*-mRNA im Herzgewebe infizierter *Stat2*^{-/-} Mäuse nachgewiesen werden. MCMV beginnt also den Replikationszyklus. Das ist außerhalb der Wirtszelle nicht möglich, mCMV muss daher in kardiale Zellen eingedrungen sein. Das stärkere Signal in der Leber stimmt mit den höheren Virustitern im Gewebe überein. Auch hier findet offensichtlich Virusreplikation statt. Die erfolgreichen Positiv- wie Negativkontrollen validieren das Ergebnis. CMV infiziert das Herz, es ist jedoch noch unklar, welche kardialen Zellpopulationen im Einzelnen betroffen sind.

4.1.3 Untersuchung der Herzschiidigung in CMV-infizierten Mäusen

Eine CMV-induzierte Myokarditis geht häufig mit einer Herzschiidigung einher. Beim Untergang von Kardiomyozyten kommt es zur Freisetzung von kardialem Troponin. Im klinischen Alltag wird die Konzentration von kardialem Troponin als Nachweis für eine Herzschiidigung durch Untergang von Kardiomyozyten herangezogen.

Zur Untersuchung der Herzschiidigung von mCMV-infizierten *Stat2*^{-/-} und entsprechenden WT Mäusen wurden Serumproben entnommen und mit Hilfe eines ELISAs die Konzentration von kardialem Troponin I in ng pro mL Serum bestimmt. Die untere Detektionsgrenze des ELISAs lag bei 0,039 ng/mL, die obere bei 2,5 ng/mL. Um zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt es zum Untergang von Kardiomyozyten nach CMV-Infektion kommt, wurde Blutserum 3 und 4 d p.i. entnommen.

Im Blutserum CMV-infizierter Mäuse konnte drei Tage nach Infektion wenig kardiales Troponin I gemessen werden. Teils lagen die Werte unter der Detektionsgrenze. In Serum aus infizierten *Stat2*^{-/-} und entsprechenden WT Mäusen war an Tag 4 nach Infektion durchschnittlich 50 ng/mL Troponin enthalten. Die einzelnen Werte schwankten hierbei stark, sodass Höchstwerte bis über 100 ng/mL gemessen wurden (Abb. 6).

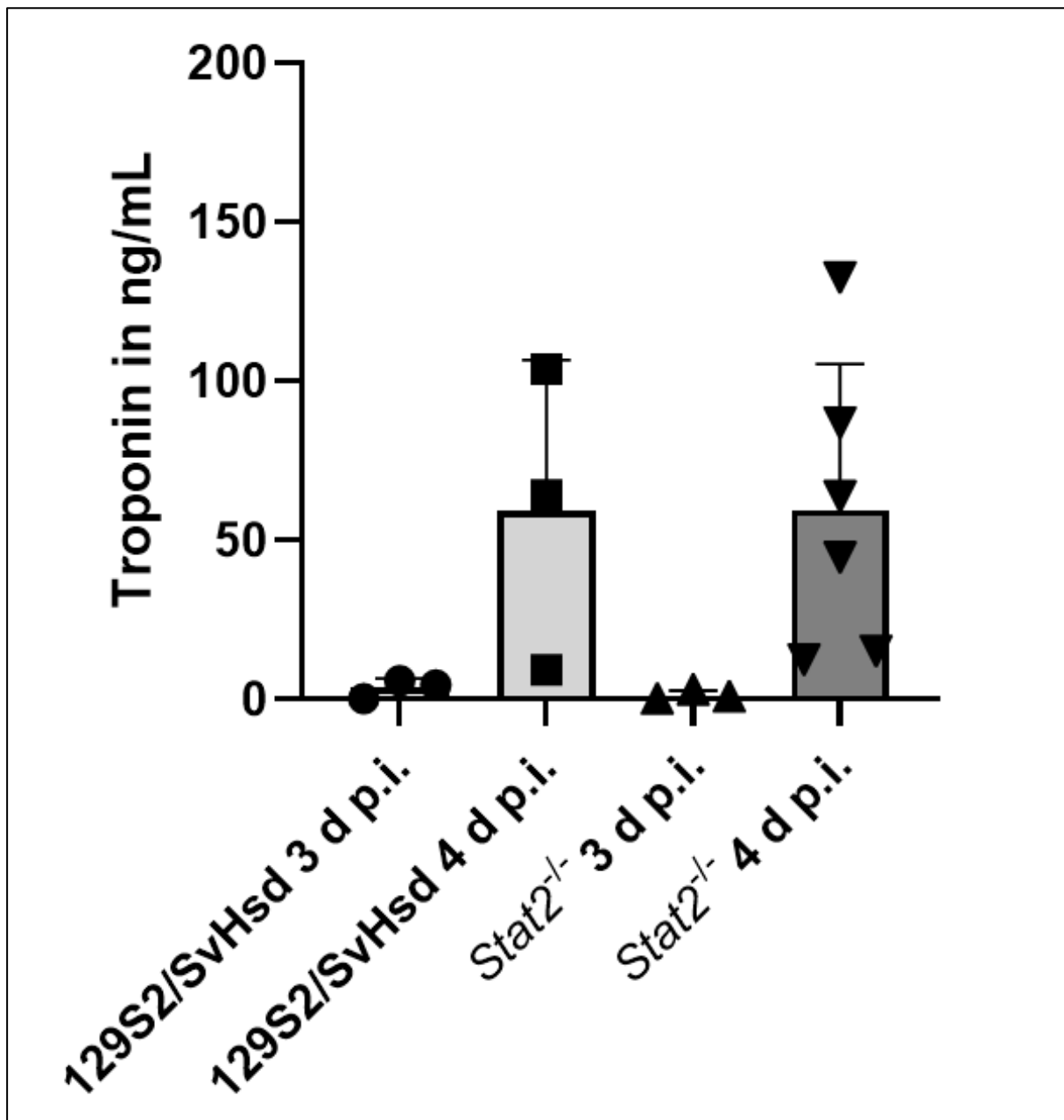


Abb. 6: Bestimmung der Troponinkonzentration aus dem Blutserum CMV-infizierter Mäuse 3 und 4 d p.i.

Mäuse wurden mit mCMV infiziert und das Blutserum 3 und 4 d p.i. gewonnen. Mit Hilfe eines ELISAs gegen kardiales Troponin I wurde die Troponinkonzentration in ng/mL Serum bestimmt. Proben aus 129S2/SvHsd und *Stat2*^{-/-} Tieren Tag 3 n=3, *Stat2*^{-/-} Tag 4 n=6. Mittelwert und Standardabweichung.

Es konnte zu beiden Zeitpunkten in infizierten Mäusen kardiales Troponin I gemessen werden. 3 d p.i. lag die Konzentration jedoch nur knapp über der unteren Detektionsgrenze des ELISAs. 4 d p.i. wurden deutlich höhere Konzentrationen gemessen. Es liegen also Hinweise vor, dass eine Herzmuskeldestruktion nach CMV-Infektion vorliegt.

4.1.4 Cytomegalovirus infiziert verschiedene kardiale Zelltypen

In vitro Experimente ermöglichen die Untersuchung von einzelnen Zellpopulationen ohne Einwirkungen von Hormonen oder dem Immunsystem. Intrazelluläre Immunstrategien bleiben erhalten, doch die extrazelluläre angeborene und erworbene Immunantwort hat keinen Einfluss auf die zu untersuchenden Zellen. Um zu untersuchen, ob CMV in der Lage ist, bei einer geschwächten Immunreaktion kardiale Zellen zu infizieren, eignet sich dieses System hervorragend.

Aus dem adulten Mauserzen von *Mif^{-/-}* und den entsprechenden WT Tieren wurden ventrikuläre Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten isoliert. Nach Anheftung an den Kulturuntergrund wurde Kulturmedium mit mCherry-mCMV, MOI 1, auf die Zellen gegeben. Das Virus exprimiert das fluoreszierende Protein mCherry, das nach Anregung mit einem Laser geeigneter Wellenlänge Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich emittiert. Infizierte Zellen können so mittels Konfokalmikroskopie anhand des spezifischen Fluoreszenzsignals identifiziert werden. Um Autofluoreszenz der Zellen auszuschließen, wurden auch mock infizierte Zellen untersucht. Zur Verifizierung des mCherry-Signals und der eindeutigen Zuordnung zu mCMV wurde zusätzlich eine Antikörperfluoreszenzmarkierung durchgeführt. Hierbei wurde das Glykoprotein B markiert, welches für das Anheften des Virus an die Wirtszelle verantwortlich ist. Dieses Protein gehört zu den spät im Replikationszyklus synthetisierten Proteinen. Eine intrazelluläre Lokalisation lässt daher darauf schließen, dass die Replikation nicht nur begonnen wurde, sondern bereits weit fortgeschritten ist.

Es wurden unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte für die Infektion gewählt, indem die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Lichtmikroskop begutachtet wurden. Ein Formverlust durch Schrumpfen oder Abrunden der Zellen vom Kulturuntergrund galt dabei als Indiz für eine gelungene Infektion. Da isolierte adulte Kardiomyozyten in Kultur nur eine begrenzte Lebensdauer haben, wurden die Zellen bereits vier Stunden nach Infektion verwendet. Endothelzellen und Fibroblasten wurden nach 24 Stunden untersucht. In den Kardiomyozyten wurde keine Eigenfluoreszenz von mCMV über das mCherry-Protein gemessen. Die Antikörpermarkierung von Glykoprotein B ergab jedoch ein Fluoreszenzsignal rund um die Zellmembran. In mock infizierten Kardiomyozyten war dies nicht zu sehen (Abb. 7, A). Infizierte Endothelzellen zeigten sowohl ein mCherry-Signal in der gesamten Zelle inklusive Zellkern als auch eines für Glykoprotein B um den Zellkern herum. Nicht infizierte benachbarte Zellen in der infizierten Population sowie mock infizierte Zellen zeigten keines der beiden Fluoreszenzsignale (Abb. 7, B). Ebenso konnte in Fibroblasten sowohl mCherry als auch Glykoprotein B detektiert werden. Nicht infizierte benachbarte sowie mock infizierte Zellen zeigten keine Fluoreszenz (Abb. 7, C).

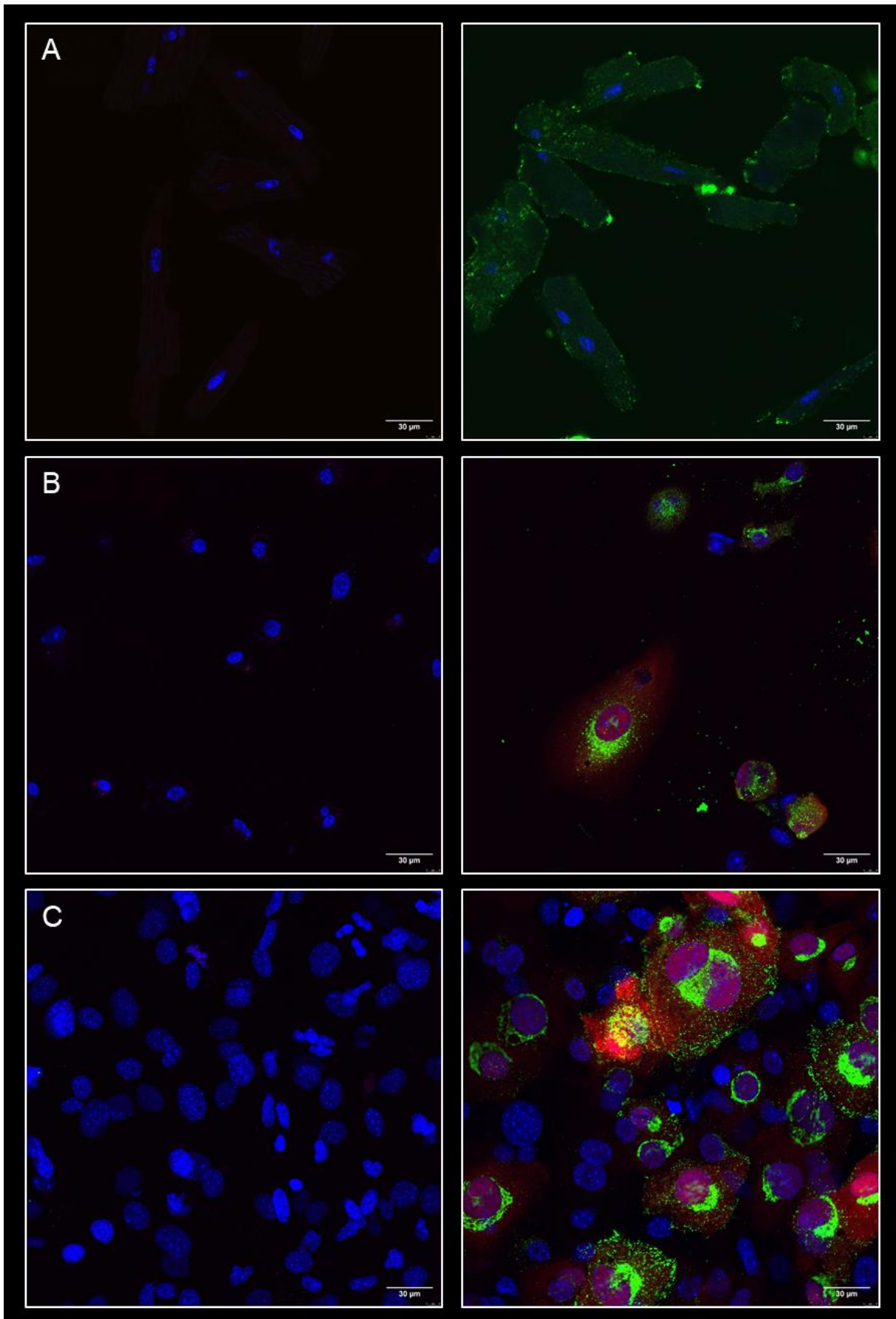


Abb. 7: Untersuchung der mCMV-Infektion in isolierten kardialen Zellen.

4. Ergebnisse

Kardiomyozyten (Reihe A), Endothelzellen (Reihe B) und Fibroblasten (Reihe C) wurden aus dem adulten Mausherzen isoliert und für 4 h (A, rechts) bzw. für 24 h (B und C, jeweils rechts) mit mCherry-mCMV, MOI 1, infiziert (rot). Glykoprotein B wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert (grün). Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Mock infizierte Zellen (links) dienen als Kontrolle. 63-fache Vergrößerung, gezeigte Aufnahme exemplarisch für Zellen aus Balb/C (WT) Mäusen.

mCMV infiziert verschiedene kardiale Zelltypen. Nach 24 h konnte in Endothelzellen und Fibroblasten mCMV-Fluoreszenz intrazellulär nachgewiesen werden. Ebenso fand Replikation statt. Trotz einer verwendeten MOI von 10 wurden nicht alle Zellen infiziert. Da aufgrund der Versuchsansätze in Kammerobjektträgern keine Zentrifugation möglich war, ist eine gewisse Schwankung in der Infektionsrate wahrscheinlich. In Kardiomyozyten war bereits nach 4 h eine Anheftung von mCMV an die Zellen zu sehen. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Infektion aller untersuchten kardialen Zelltypen durch mCMV möglich ist.

Um zu überprüfen, ob sich die Schlussfolgerungen auch auf das humane System übertragen lassen, wurden humane Kardiomyozyten (HCM), Endothelzellen (HCAEC) und Fibroblasten (HCF) mit EGFP-hCMV infiziert. Wie zuvor mCherry-mCMV exprimiert dieser Virusstamm das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Eine Identifikation infizierter Zellen ist somit direkt möglich. Um Autofluoreszenz auszuschließen und das Fluoreszenzsignal zu verifizieren, wurden mock infizierte Kontrollen untersucht und zusätzlich das Tegumentprotein pp65 mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. Wie Glykoprotein B ist pp65 auch ein spät synthetisiertes Protein und somit ein Anzeichen für fortgeschrittene Virusreplikation. Da HCMs länger kultivierbar sind als adulte murine Kardiomyozyten, ist hier eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum möglich.

Wie zuvor wurden die Untersuchungszeitpunkte durch Begutachtung der Zellen im Lichtmikroskop gewählt. Diese lagen für HCMs bei 48 Stunden und für HCAECs und HCFs bei fünf Tagen. In den HCMs konnte EGFP über die ganze Zelle verteilt und pp65 insbesondere im Bereich des Zellkerns detektiert werden. In den mock infizierten Zellen war kein Fluoreszenzsignal in den betreffenden Wellenlängenbereichen zu erkennen (Abb. 8, A). In den HCAECs konnte EGFP in der ganzen Zelle, besonders aber im Bereich des Zellkerns detektiert werden. Das Tegumentprotein pp65 wurde in Zellen mit EGFP-Signal außerhalb des Zellkerns und in benachbarten Zellen ohne EGFP-Signal innerhalb des Zellkerns erfasst. Es konnten nicht alle Zellen infiziert werden. Mock oder andere nicht infizierte Zellen zeigten keine Fluoreszenzsignale für hCMV (Abb. 8, B). In HCFs wurde EGFP wie in HCAECs intrazellulär besonders im Bereich des Zellkerns erkannt, pp65 vermehrt außerhalb des Zellkerns. Mock infizierte Zellen zeigen keine entsprechenden Signale (Abb. 8, C).

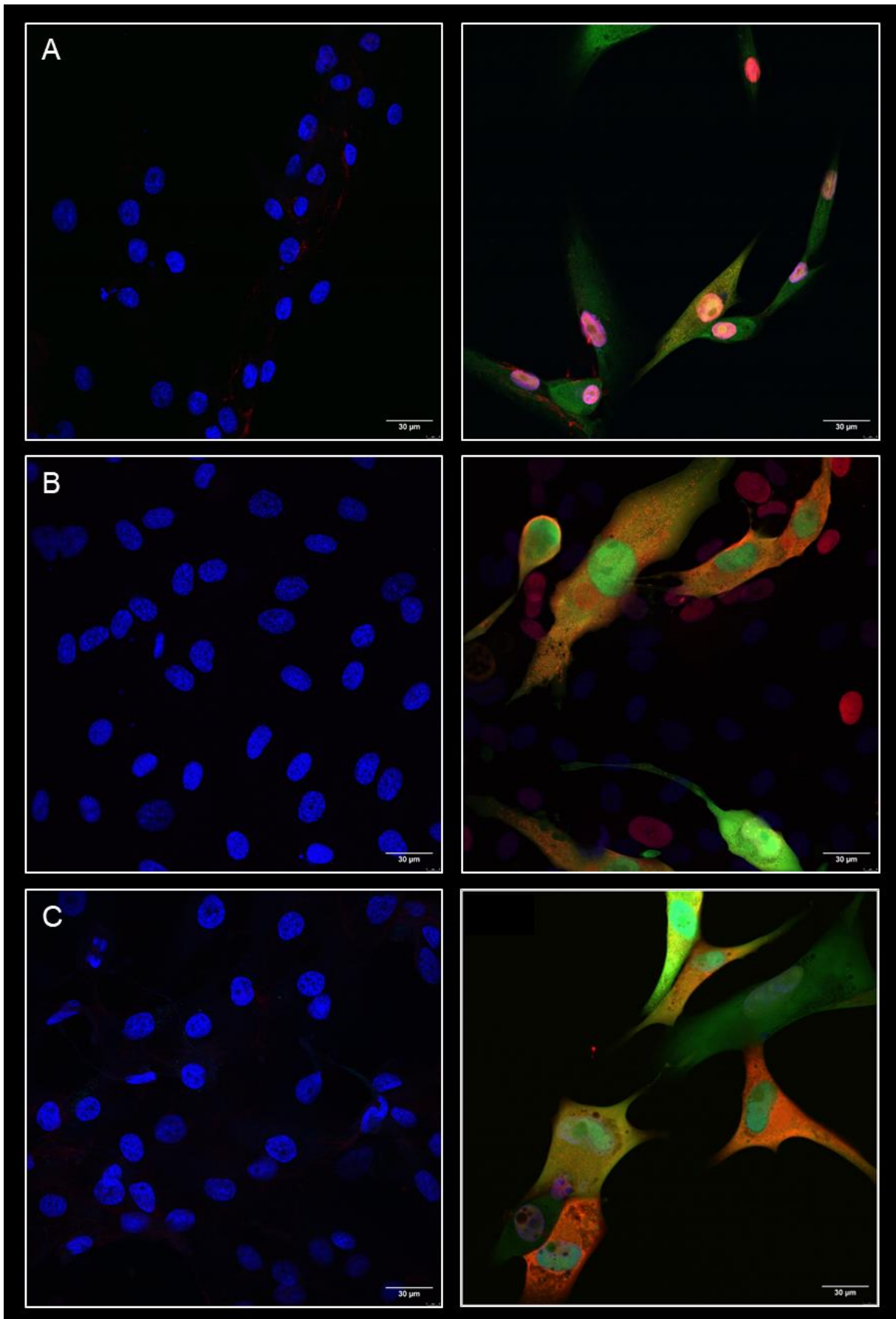


Abb. 8: Untersuchung der hCMV-Infektion in kardialen Zellen.

4. Ergebnisse

HCMs (Reihe A), HCAECs (Reihe B) und HCFs (Reihe C) wurden für 48 h (A, rechts) bzw. für 5 d (B und C, jeweils rechts) mit EGFP-hCMV, MOI 1, infiziert (grün). Tegumentprotein pp65 wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert (rot). Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Mock infizierte Zellen (links) dienten als Kontrolle. 63-fache Vergrößerung.

In allen humanen kardialen Zelltypen wurde hCMV über die EGFP-Fluoreszenz und den Nachweis des Tegumentproteins pp65 detektiert. Anhand der unterschiedlichen zellinternen Lokalisation der jeweiligen Signale befinden sich die Zellen in verschiedenen Replikationsstadien. In der Fraktion der HCAECs fand sich das pp65-Signal auch in benachbarten Zellen, die kein EGFP aufwiesen. Möglicherweise wird EGFP später exprimiert als das Tegumentprotein. HCMV kann alle kardialen Zellen infizieren und den Replikationszyklus durchführen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus der Literatur (14, 73). Mit Ausnahme der murinen Kardiomyozyten eigneten sich die untersuchten Zellen also als Modell für die Untersuchung der Parthanatose. Für *in vitro* Versuche mit murinen Zellen wurden daher nur Endothelzellen und Fibroblasten weiter untersucht.

4.2 Cytomegalovirus führt in infizierten Zellen zur Parthanatose

4.2.1 Kardiale Zellen zeigen PARP-1 Aktivierung nach Infektion mit CMV

Infizierte Zellen haben verschiedene Strategien, um die Infektion zu bekämpfen. Eine Möglichkeit, die Ausbreitung der Infektion zu verhindern, ist der kontrollierte Zelluntergang durch Apoptose oder Nekroptose. Diese Signalwege werden jedoch durch CMV unterdrückt (73). CMV induziert Schäden an spezifischen Stellen in der DNA der Wirtszelle (74). Sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche führen zur Aktivierung des Enzyms PARP-1 (75). Die Überaktivierung von PARP-1 ist charakteristisch für den Zelltodsignalweg der Parthanatose. Im Rahmen der CMV-vermittelten Retinitis konnte gezeigt werden, dass Zelluntergang durch Parthanatose stattfindet (17, 69). Auf der einen Seite kann die Ausbreitung der Infektion hierdurch begrenzt werden. Auf der anderen Seite wirkt das Absterben von Zellen durch Parthanatose inflammatorisch, was Folgeschäden im Gewebe nach sich ziehen kann.

Um die Einleitung der Parthanatose zu untersuchen, wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung das PAR Polymer detektiert. Eine übermäßige Aktivierung von PARP-1 führt somit auch zu einer verstärkten Synthese von PAR. In murinen kardialen Endothelzellen konnte in infizierten Zellen ein starkes punktförmiges PAR-Signal in und um den Zellkern beobachtet werden. Über die gesamte Zelle verteilt wurde ein etwas schwächeres Signal detektiert. Auch benachbarte nicht infizierte Zellen zeigten intrazellulär ein schwaches Fluoreszenzsignal für PAR. In mock infizierten Zellen war dies nicht der Fall (Abb. 9, A). In Fibroblasten wurde PAR sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten benachbarten Zellen detektiert. Es gab keine deutliche Differenz in der Intensität der Fluoreszenz. Vereinzelt traten

punktförmige Signale im Bereich und um den Zellkern herum auf. In mock infizierten Zellen wurde PAR nur vereinzelt und schwach detektiert (Abb. 9, B).

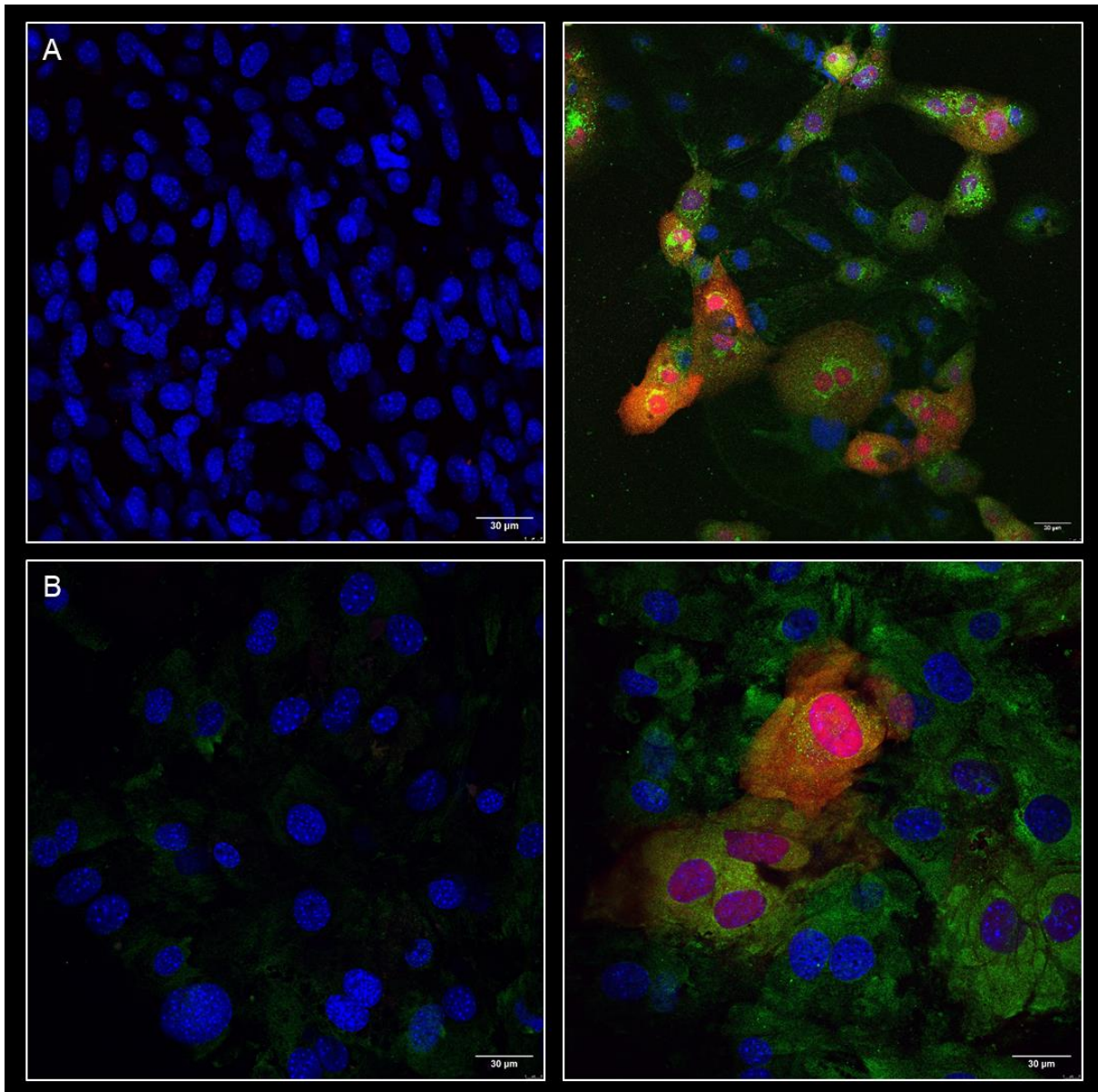


Abb. 9: Detektion von PAR in mCMV-infizierten Zellen.

Endothelzellen (Reihe A) und Fibroblasten (Reihe B) wurden aus dem adulten Mauserzen isoliert und für je 24 h mit EGFP- (Endothelzellen) bzw. mCherry-mCMV (Fibroblasten), MOI 1, infiziert (jeweils rechts, rot). PAR wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert (grün). Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Mock infizierte Zellen (links) dienen als Kontrolle. 63-fache Vergrößerung.

Infizierte murine Zellen zeigten einen deutlichen Anstieg in der Fluoreszenzintensität von PAR im Vergleich zu mock infizierten Zellen. Daneben waren auch benachbarte nicht infizierte Zellen betroffen. Möglicherweise befindet sich die Infektion jedoch noch im Anfangsstadium, sodass keine Eigenfluoreszenz von mCMV detektiert werden kann, obwohl bereits eine

Infektion stattgefunden hat. Ebenso könnten benachbarte Zellen antivirale Signale der bereits infizierten Zellen registriert und darauf reagiert haben.

Um die Parthanatose auch im humanen System zu untersuchen, wurden HCMs, HCAECs und HCFs mit EGFP-hCMV infiziert und PAR mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. In infizierten HCMs konnte ein deutliches Fluoreszenzsignal von PAR identifiziert werden. Dieses Signal war in seiner Intensität unabhängig von dem EGFP-Signal von hCMV. Mock infizierte Zellen zeigten ein schwaches PAR-Signal (Abb. 10, A). Infizierte HCAECs zeigten ebenfalls eine deutliche Fluoreszenz für PAR. Auch in nicht infizierten benachbarten Zellen konnte PAR detektiert werden. In mock infizierten Zellen war das Signal geringfügig schwächer (Abb. 10, B). Auch in infizierten HCFs wurde PAR intrazellulär detektiert. In mock infizierten Zellen war die Signalintensität schwächer (Abb. 10, C).

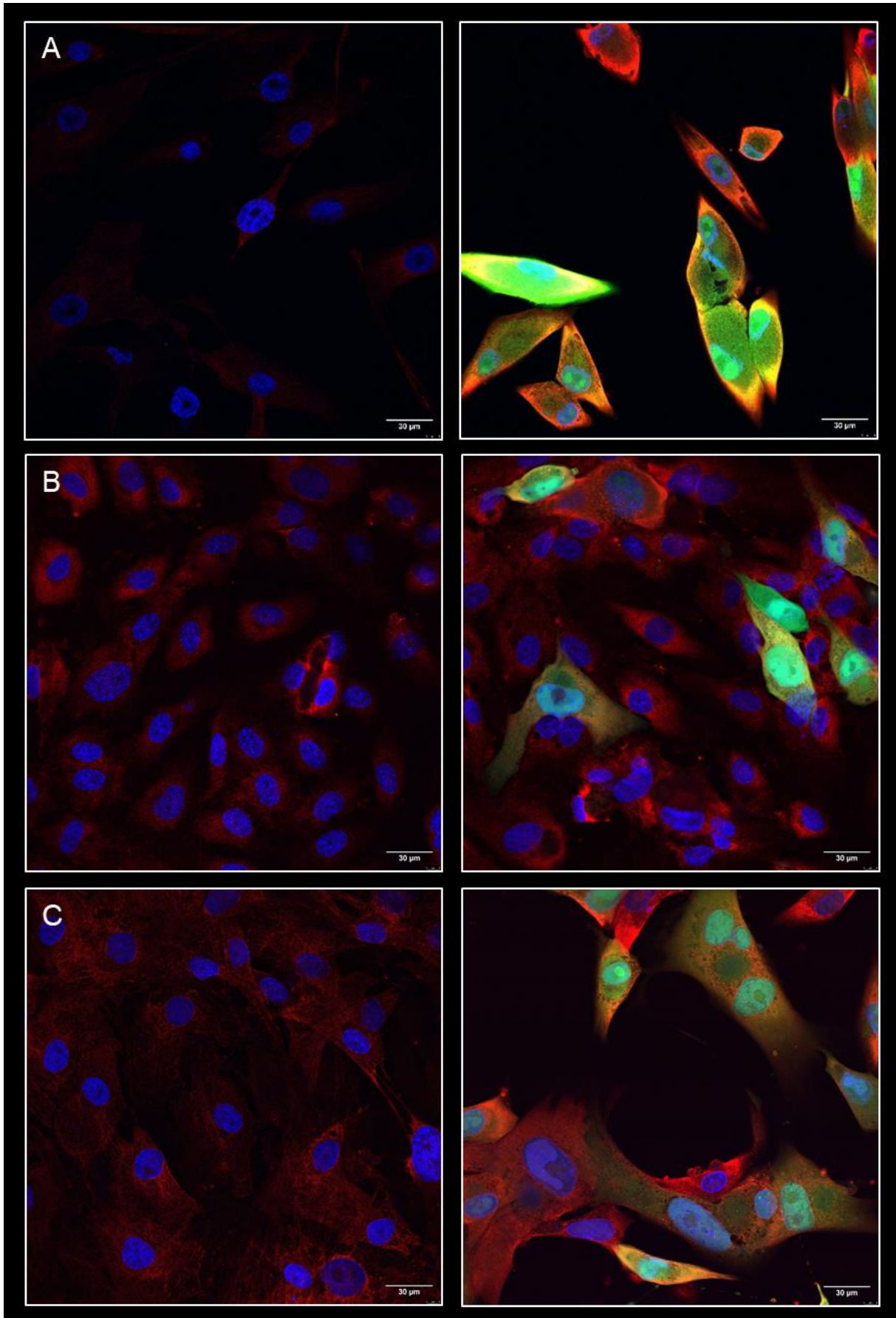


Abb. 10: Detektion von PAR in hCMV-infizierten Zellen.

HCMs (Reihe A), HCAECs (Reihe B) und HCFs (Reihe C) wurden für 48 h (A, rechts) bzw. für 5 d (B und C, jeweils rechts) mit EGFP-hCMV, MOI 1, infiziert (grün). PAR wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert (rot). Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Mock infizierte Zellen (links) dienten als Kontrolle. 63-fache Vergrößerung.

Es kam in infizierten humanen kardialen Zellen zu einem teilweise deutlichen Anstieg der PAR-Intensität. Daraus lässt sich eine verstärkte PARP-1 Aktivität ableiten. In HCAECs zeigten auch mock infizierte Zellen ein stärkeres Signal. Die Zellen waren möglicherweise aufgrund anderer Umstände (zu hohe Zelldichte, Nährstoffknappheit, pH-Schwankungen) bereits leicht gestresst.

CMV-infizierte Zellen zeigten erhöhte PAR-Intensität. Diese heben sich von mock infizierten Zellen ab. Teilweise sind auch benachbarte nicht infizierte Zellen betroffen. Es kommt daher in CMV-infizierten kardialen Zellen zu einer starken Aktivierung von PARP-1. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass im weiteren Infektionsverlauf auch die Parthanatose ausgelöst wird.

4.2.2 MIF bildet mit AIF den für die Parthanatose notwendigen Proteinkomplex in CMV-infizierten kardialen Zellen

Eine übermäßige Bildung von PAR resultiert in einer Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien. Im Zytosol kommt es zur Bindung von MIF an AIF. Dieser Komplex ist notwendig für den weiteren Verlauf der Parthanatose. MIF kann ohne AIF nicht in den Zellkern migrieren, um dort mittels seiner Endonuklease-Aktivität die DNA zu fragmentieren. AIF kann ohne Bindung an MIF zwar in den Zellkern migrieren, zur DNA-Fragmentierung und somit auch zur Auslösung des Zelltods ist jedoch MIF nötig (49).

Um zu untersuchen, ob in CMV-infizierten Zellen eine Bindung von MIF an AIF stattfindet, wurde in murinen Zellen ein Proximity Ligation Assay (PLA) durchgeführt. Hierbei wird ein Fluoreszenzsignal emittiert, wenn sich zwei zu untersuchende Proteine in einer räumlichen Nähe von bis zu 40 nm befinden (76). Des Weiteren ermöglicht der PLA die Lokalisation des untersuchten Proteinkomplexes innerhalb der Zelle.

In mCMV-infizierten Endothelzellen konnten Fluoreszenzsignale der MIF/AIF-Interaktion detektiert werden. Diese befinden sich über die ganze Zelle verteilt, vereinzelt auch im Bereich des Zellkerns. In mock infizierten Zellen gibt es teils Signale schwacher Fluoreszenzintensität, die auf eine räumliche Nähe von MIF und AIF hinweisen (Abb. 11, A). In mCMV-infizierten Fibroblasten wurden ebenfalls PLA-Signale detektiert. Diese sind zellweit lokalisiert, einige im Bereich des Zellkerns. In mock infizierten Zellen konnten keine Fluoreszenzsignale einer MIF/AIF-Interaktion identifiziert werden (Abb. 11, B).

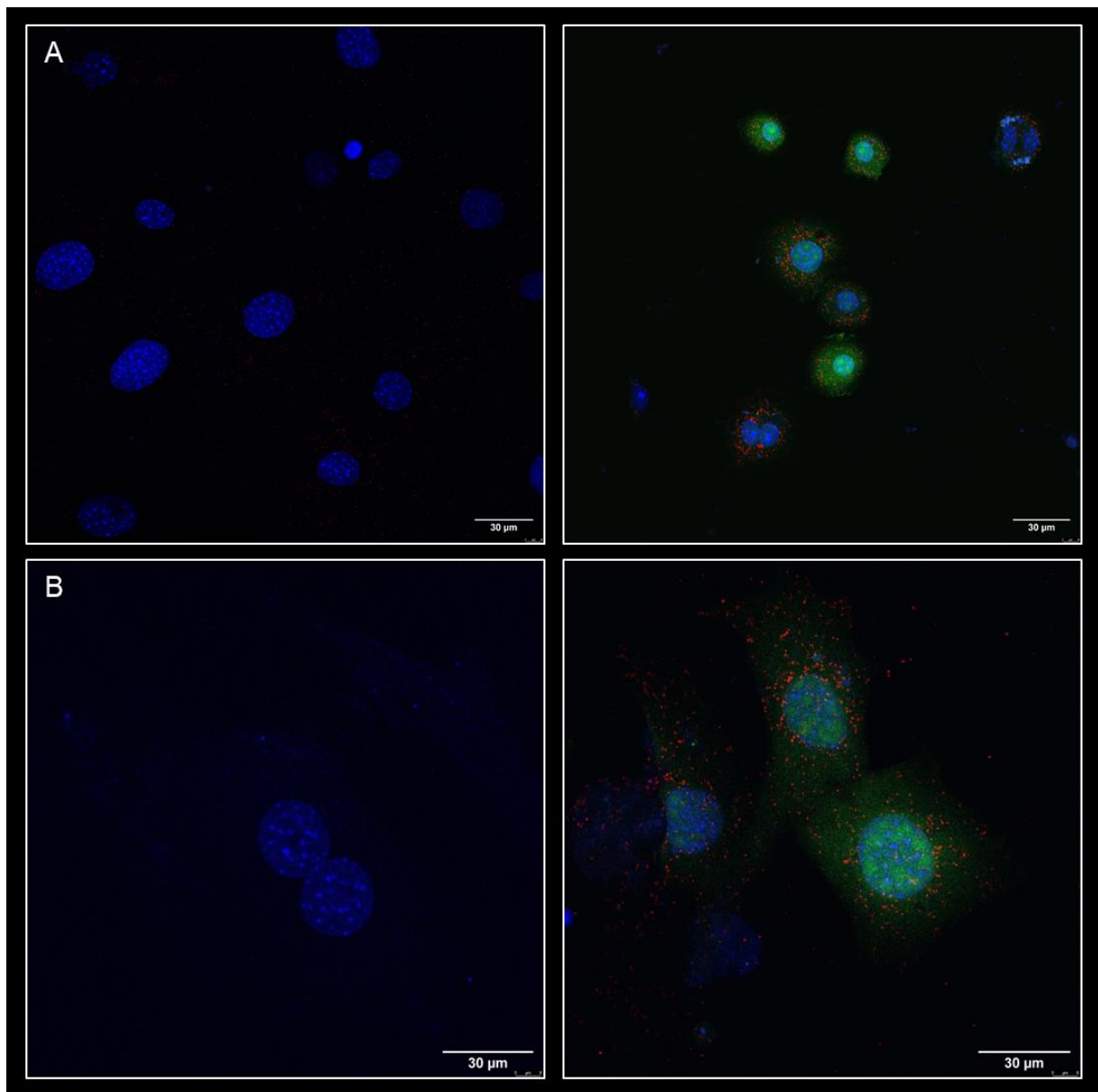


Abb. 11: Interaktion von MIF und AIF mittels Proximity Ligation Assay.

Kardiale Endothelzellen (Reihe A) und Fibroblasten (Reihe B) wurden aus dem adulten Mausherzen isoliert und für je 24 h mit EGFP-mCMV, MOI 1, infiziert (grün). Interaktionspunkte von MIF und AIF wurden mittels Proximity Ligation Assay detektiert (rot). Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Mock infizierte Zellen (links) dienen als Kontrolle. 63-fache Vergrößerung.

Um die beobachteten Signale spezifisch der Interaktion von MIF und AIF zuordnen zu können, wurden diverse Kontrollen durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper auszuschließen, wurde ein Ansatz ohne Primärantikörper untersucht. Hier zeigte sich kein Fluoreszenzsignal (Abb. 12, A). Um eine Autofluoreszenz der Primärantikörper oder eine unspezifische Bindung beider Sekundärantikörper an nur jeweils einen Primärantikörper auszuschließen, wurde ein Ansatz mit nur jeweils einem Primärantikörper (MIF oder AIF) durchgeführt. Hierbei zeigte sich in der Probe, die nur den Primärantikörper gegen MIF enthielt, kein Signal (Abb. 12, B). Der Ansatz, der nur den Primärantikörper gegen

AIF enthielt, zeigte ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal. Dieses ist in seiner Intensität gegenüber der Proben mit beiden Primäantikörpern vernachlässigbar (Abb. 12, C).

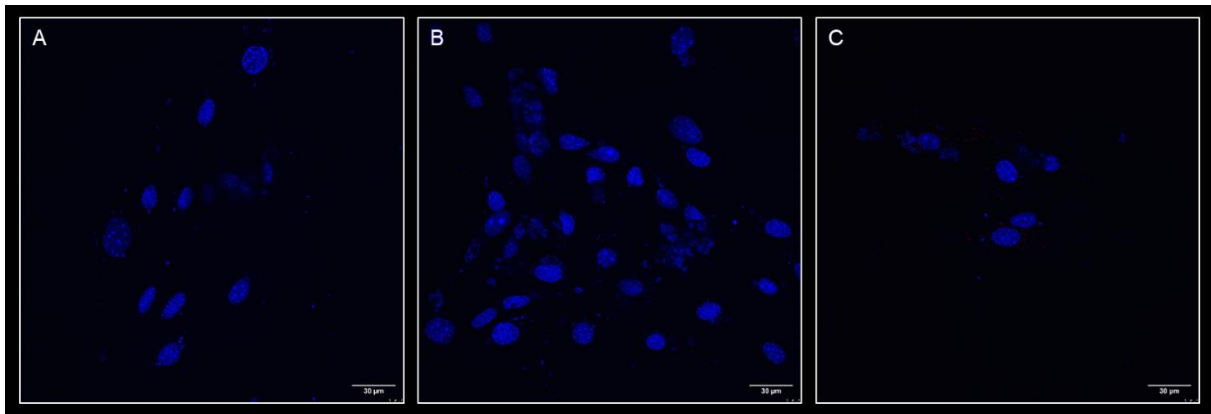


Abb. 12: Kontrollansätze des Proximity Ligation Assays.

Kardiale Endothelzellen und Fibroblasten wurden aus dem adulten Mausherzen isoliert. Es wurde ein Proximity Ligation Assay (rot) ohne Primäantikörper (A), nur mit Primäantikörper gegen MIF (B) oder nur mit Primäantikörper gegen AIF (C) durchgeführt. Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). 63-fache Vergrößerung, Abbildung exemplarisch in Endothelzellen.

In mCMV-infizierten kardialen Zellen konnte ein deutlicher Anstieg an Fluoreszenzsignalen für eine räumliche Nähe von MIF und AIF erkannt werden. Dies ist in mock infizierten Zellen kaum oder nicht der Fall. Die Kontrollen ließen die Schlussfolgerung zu, dass das detektierte Signal spezifisch für eine mögliche Interaktion von MIF und AIF ist.

Eine räumliche Nähe zweier Proteine lässt mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf eine Interaktion der beiden Proteine miteinander schließen, ist jedoch kein zweifelsfreier Nachweis. Um eine Bindung von MIF an AIF zu verifizieren, wurde eine Co-Immunpräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Diese Methode erlaubt es, Proteine in ihrem nativen Zustand mitsamt ihren Bindungspartnern zu isolieren. Mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot ist es anschließend möglich, diese Bindungspartner zu identifizieren. Da für diese Methode eine Mindestmenge an Protein und somit eine hohe Zellzahl erforderlich ist, wurde dieser Versuch nur in humanen Zellen durchgeführt.

HCMs, HCAECs und HCFs wurden mit EGFP-hCMV infiziert und AIF mittels Co-IP präzipitiert. Mock infizierte Zellen dienten als Kontrolle. Um zu überprüfen, ob die in der Co-IP eingesetzten magnetischen Beads nicht unspezifisch binden, wurde ein Ansatz ohne Antikörper und ein Ansatz mit einer unspezifischen IgG-Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Mit Hilfe des Western Blots sollten anschließend sowohl AIF als auch MIF detektiert werden. Um durch den in der Co-IP eingesetzten Antikörper gegen AIF Störsignale im Western Blot zu vermeiden, wurde in der Detektion die Substanz Veriblot verwendet, welche nur intakte Antikörper erkennt. Ein Signal für AIF sollte in einer Höhe von 57 kDa detektiert werden, für MIF in Höhe von 12 kDa.

4. Ergebnisse

In allen humanen Zelltypen konnten mehrere Banden detektiert werden. Eine Bande lag auf einer Höhe von ca. 55 kDa, eine zweite knapp unter 14 kDa. Die Banden wurden daher AIF und MIF zugeordnet. AIF war in allen Zellen zu erkennen, die Signalintensität schwankte jedoch. In hCMV-infizierten HCFs wurde auch eine dritte Bande in Höhe von 62 kDa detektiert. MIF konnte ebenfalls in allen Zellen detektiert werden. Die Signalintensität war in infizierten Proben stärker als in mock infizierten mit Ausnahme der HCFs, wo das Signal in mock infizierten Zellen geringfügig stärker war. In dem Ansatz ohne Antikörper wurde kein Signal detektiert, in der IgG-Isotyp-Kontrolle wurden mehrere Banden detektiert, darunter auch eine in Höhe von AIF (Abb. 13).

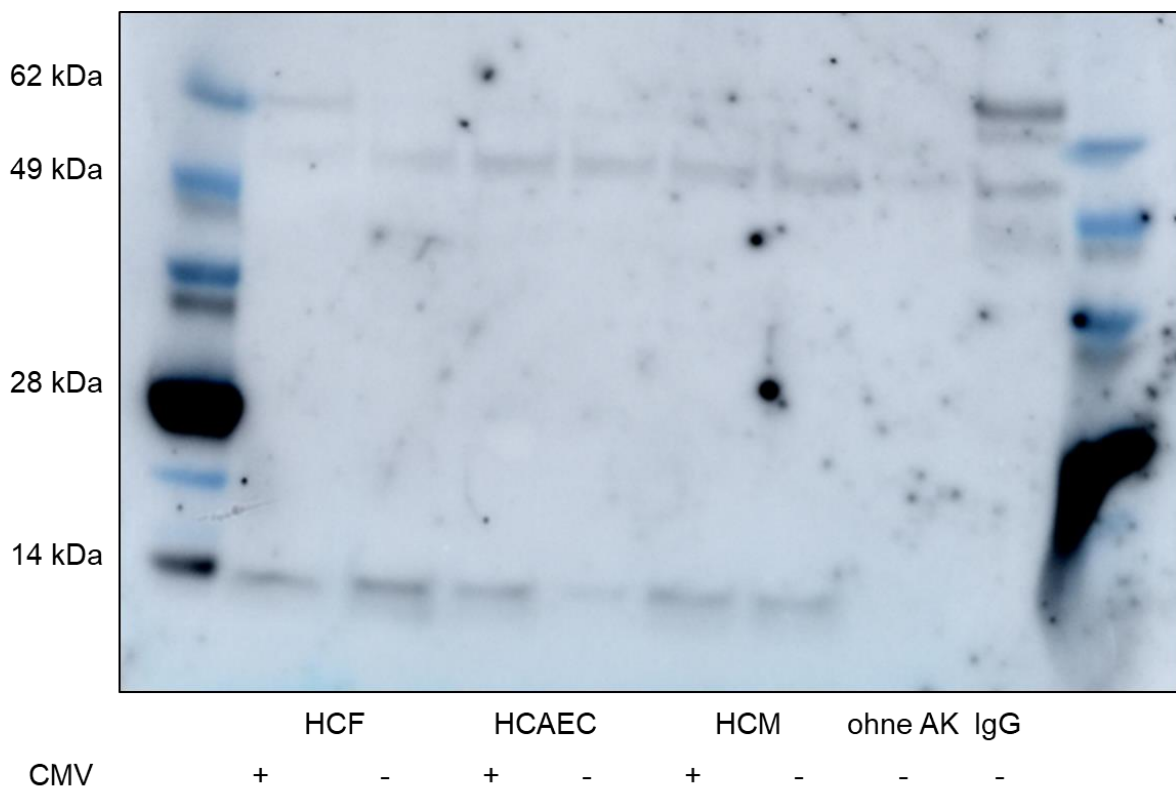


Abb. 13: Co-Immunopräzipitation von AIF und MIF in humanen kardialen Zellen.

HCMs, HCAECs und HCFs wurden mit EGFP-hCMV infiziert und eine Co-IP gegen AIF durchgeführt. Das Präzipitat wurde mittels Western Blot untersucht. Mock infizierte Zellen dienten als Kontrolle, ebenso wurde eine Kontrolle ohne Antikörper (AK) und als IgG-Isotypkontrolle durchgeführt. AIF wurde in Höhe von 57 kDa detektiert, MIF in Höhe von 12 kDa. Ein Marker zur Laufhöhenbestimmung wurde jeweils links und rechts aufgetragen.

Es konnte in allen kardialen Zellen eine Bindung von MIF an AIF nachgewiesen werden. Diese war mit Ausnahme der HCFs in infizierten Zellen verstärkt. Auch in mock infizierten Zellen fand eine MIF/AIF-Interaktion statt. Dies könnte durch die Verarbeitung der Zellen während der Probenaufbereitung geschehen sein.

Im Zusammenhang mit den Erkenntnissen des PLAs lässt sich ableiten, dass es in CMV-infizierten kardialen Zellen zu einer Interaktion von MIF und AIF kommt. Ein weiterer zentraler Schritt im Ablauf der Parthanatose wird somit in Gang gesetzt.

4.2.3 Der Proteinkomplex aus MIF und AIF ist im Zellkern lokalisiert

Zur Aktivierung der Endonuklease-Fähigkeit von MIF muss dieser zunächst in den Zellkern gelangen und dort an die DNA binden. AIF ist dabei als Bindungspartner essenziell. Um die Lokalisation von MIF und AIF innerhalb der Zelle zu untersuchen, wurden MIF und AIF in CMV-infizierten Zellen mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. Eine Aufnahme mittels Konfokalmikroskopie erlaubt die Ansicht einer Fokusebene. Fluoreszenzsignale in darunter und darüber liegenden Ebenen werden ebenfalls aufgenommen, sind jedoch weniger intensiv und erscheinen unscharf.

In murinen kardialen Zellen kam es in mMCV-infizierten Zellen zu einer Intensivierung der Fluoreszenzsignale von MIF und AIF. In mock infizierten Zellen waren sowohl MIF als auch AIF über die ganze Zelle mit Ausnahme des Zellkerns verteilt. Im Bereich des Zellkerns nahm die Fluoreszenzintensität stark ab (Abb. 14, D links). In mMCV-infizierten Zellen fanden sich vereinzelt starke Fluoreszenzsignale von AIF im Bereich des Zellkerns (Abb. 14, C rechts). Das Signal von MIF korrelierte damit, die Fluoreszenz der DNA nahm in diesem Bereich etwas ab (Abb. 14, gekennzeichnet in E durch weiße Pfeile).

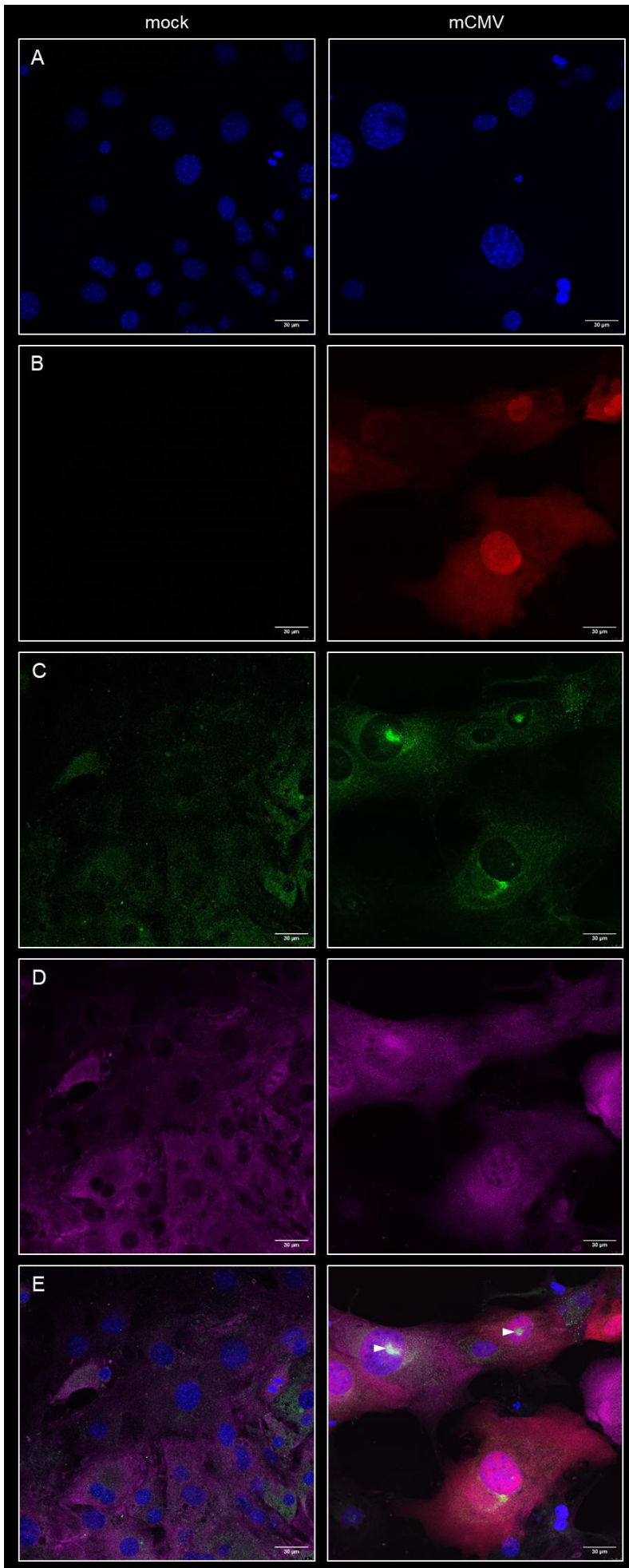


Abb. 14: Lokalisation von MIF und AIF in mCMV-infizierten kardialen Zellen.

Kardiale Endothelzellen und Fibroblasten wurden aus dem adulten Mauserzen isoliert und für 24 mit mCherry-mCMV, MOI 1, infiziert (rot). Mock infizierte Zellen dienten als Kontrolle. AIF (grün) und MIF (magenta) wurden mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Eine gemeinsame Lokalisation von AIF und MIF wurde mit weißen Pfeilen deutlich gemacht. A) Zellkerne, B) mCMV, C) AIF, D) MIF und E) Overlay. 63-fache Vergrößerung. Abbildung exemplarisch in Fibroblasten.

In humanen kardialen Zellen kam es in hCMV-infizierten Zellen ebenfalls zu einem Anstieg der Signalintensität von MIF. Das Signal von AIF war in seiner Intensität gleichbleibend. In mock infizierten Zellen war eine leichte AIF-Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns zu erkennen, diese war jedoch diffus und korrelierte nicht mit einem Signal von MIF, weshalb es sich hier möglicherweise um Autofluoreszenz oder ein Fluoreszenzsignal aus anderen Fokusebenen außerhalb des Zellkerns handelte (Abb. 15, C links). In infizierten Zellen kam es ebenfalls zu einer Co-Lokalisation von MIF und AIF im Bereich des Zellkerns (Abb. 15, gekennzeichnet in E durch weiße Pfeile).

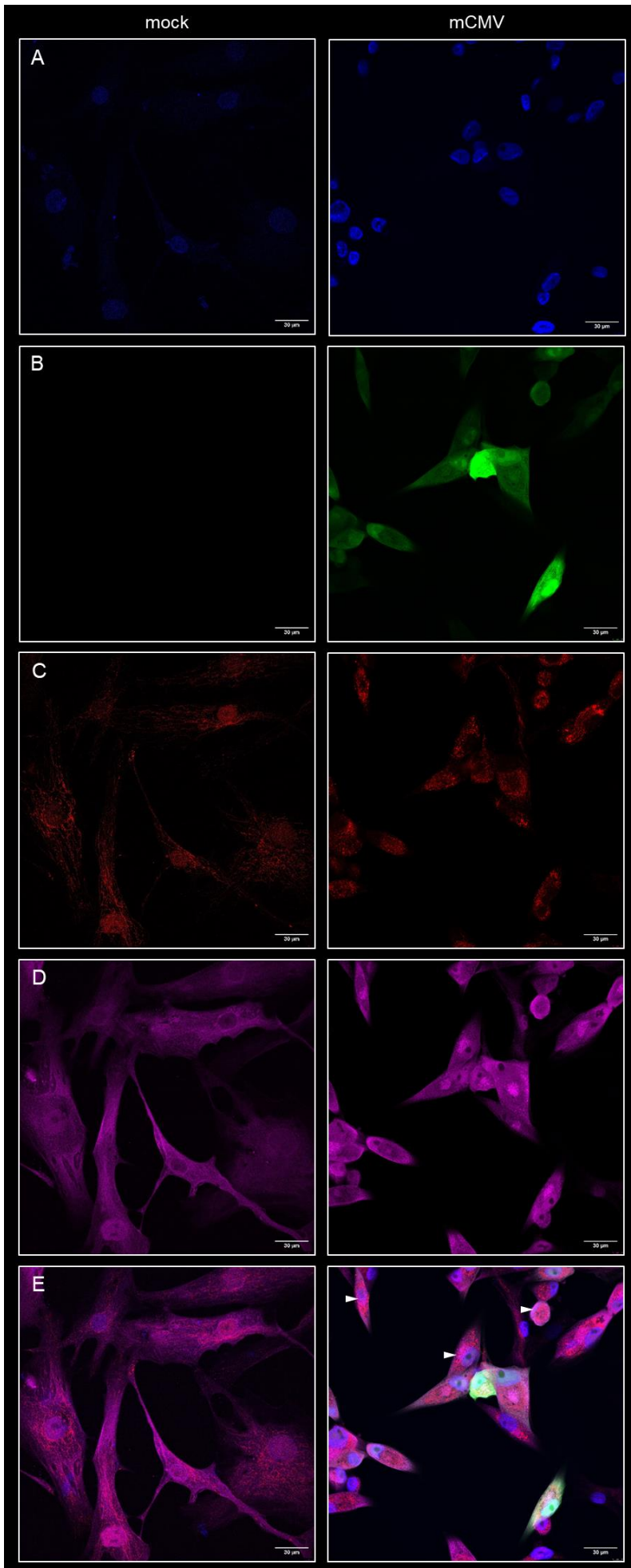


Abb. 15: Lokalisation von MIF und AIF in hCMV-infizierten kardialen Zellen.

HCMs, HCAECs und HCFs wurden für 48 h (HCMs) bzw. 5 d (HCAECs und HCFs) mit EGFP-hCMV, MOI 1, infiziert (grün). Mock infizierte Zellen dienten als Kontrolle. AIF (rot) und MIF (magenta) wurden mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). Eine gemeinsame Lokalisation von AIF und MIF wurde mit weißen Pfeilen deutlich gemacht. A) Zellkerne, B) hCMV, C) AIF, D) MIF und E) Overlay. 63-fache Vergrößerung. Abbildung exemplarisch in HCMs.

Es kommt in CMV-infizierten Zellen zu einer gemeinsamen Lokalisation von MIF und AIF im Bereich des Zellkerns. Dies ist in mock infizierten Zellen nicht zu beobachten. In murinen Zellen wird teilweise eine Abnahme der Fluoreszenzintensität im Bereich der MIF/AIF-Überlagerung gefunden. Womöglich findet hier bereits DNA-Fragmentierung durch MIF statt. MIF gelangt also als Effektorprotein der Parthanatose in den Zellkern infizierter Zellen und beginnt die DNA-Fragmentierung und somit das Absterben kardialer Zellen.

4.3 Eine Inhibition von MIF führt zu einer Verringerung an DNA-Schäden nach CMV-Infektion

MIF bindet nach der Translokation in den Zellkern mit Hilfe von AIF an die DNA und induziert mit einer Nuklease-Fähigkeit die Spaltung dieser in 20 bis 50 kba große Fragmente (49). Eine genetische Deletion oder Inhibierung von MIF führt somit zu einer Verringerung an DNA-Schäden und somit zu einem verbesserten Zellüberleben, was bereits in Neuronen gezeigt werden konnte (49). Die Fragmentierung der DNA wurde über die Phosphorylierung des Histons H2A.X untersucht. H2A.X wird bei Doppelstrangbrüchen in der DNA an Serin 139 phosphoryliert (γ H2A.X) (77). Dies ermöglicht die Rekrutierung von Reparaturfaktoren, um den Schaden zu beheben. Zugleich eignet die Detektion von γ H2A.X als Marker für DNA-Fragmentierung durch MIF (78).

Zur Untersuchung der Auswirkung einer genetischen MIF-Deletion wurden kardiale Endothelzellen und Fibroblasten aus *Mif*^{-/-} und den entsprechenden WT Mäusen isoliert und mit mCMV infiziert. DNA-Schädigung wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung von γ H2A.X detektiert. In mock infizierten Zellen konnte keine oder nur sehr wenig DNA-Schädigung entdeckt werden (Abb. 16, A). In mCMV-infizierten Zellen wiesen einige Zellen eine starke Phosphorylierung von H2A.X auf. Dies war auch teils bei benachbarten nicht infizierten Zellen der Fall (Abb. 16, B). In infizierten *Mif*^{-/-} Zellen war der Anteil an Zellen mit DNA-Schädigung deutlich geringer (Abb. 16, C).

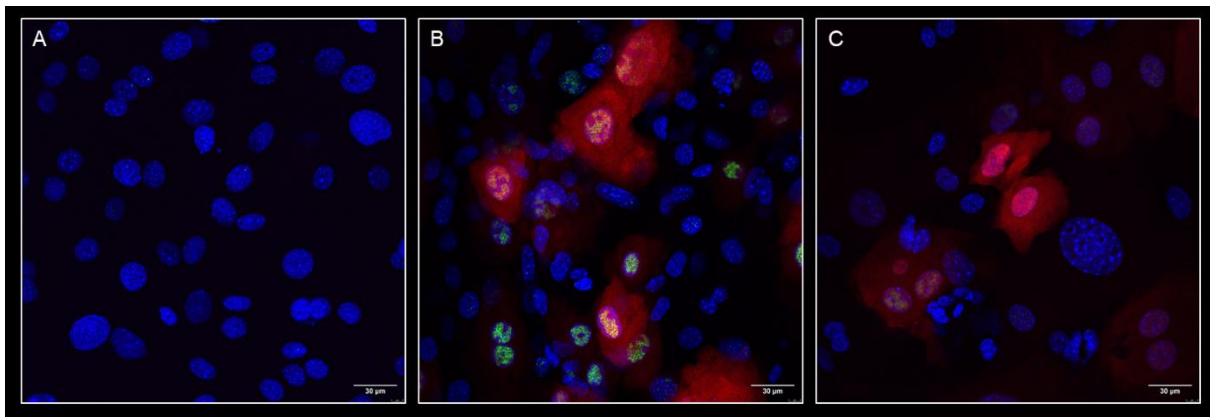


Abb. 16: Untersuchung der DNA-Fragmentierung durch MIF nach CMV-Infektion.

Kardiale Endothelzellen und Fibroblasten wurden aus dem adulten Herzen von Balb/C (A und B) und *Mif*^{-/-} Mäusen (C) isoliert und für 24 mit mCherry-mCMV, MOI 1, infiziert (rot, B und C). Mock infizierte Zellen dienten als Kontrolle (A). DNA-Doppelstrangbrüche wurden über die Phosphorylierung von H2A.X (γ H2A.X) mittels Immunfluoreszenzmarkierung detektiert (grün). Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (blau). 63-fache Vergrößerung, Abbildung hier exemplarisch in Fibroblasten.

Die so detektierten Signale wurden mit Hilfe des Programms Fiji und des Plugins Cell Counter ausgezählt. Ein Zellkern wurde als eine Zelle angesehen und je nach Infektionsstatus und DNA-Schaden klassifiziert. Betrachtete man lediglich die Population der infizierten Zellen, so war der Anteil an Zellen mit DNA-Schädigung in Endothelzellen aus *Mif*^{-/-} Mäusen gegenüber WT Tieren signifikant verringert (Abb. 17, links). In infizierten Fibroblasten war der Anteil an Zellen mit DNA-Schädigung in *Mif*^{-/-} Zellen ebenfalls deutlich geringer als in WT Zellen, hier lag jedoch keine statistische Signifikanz vor (Abb. 17, rechts).

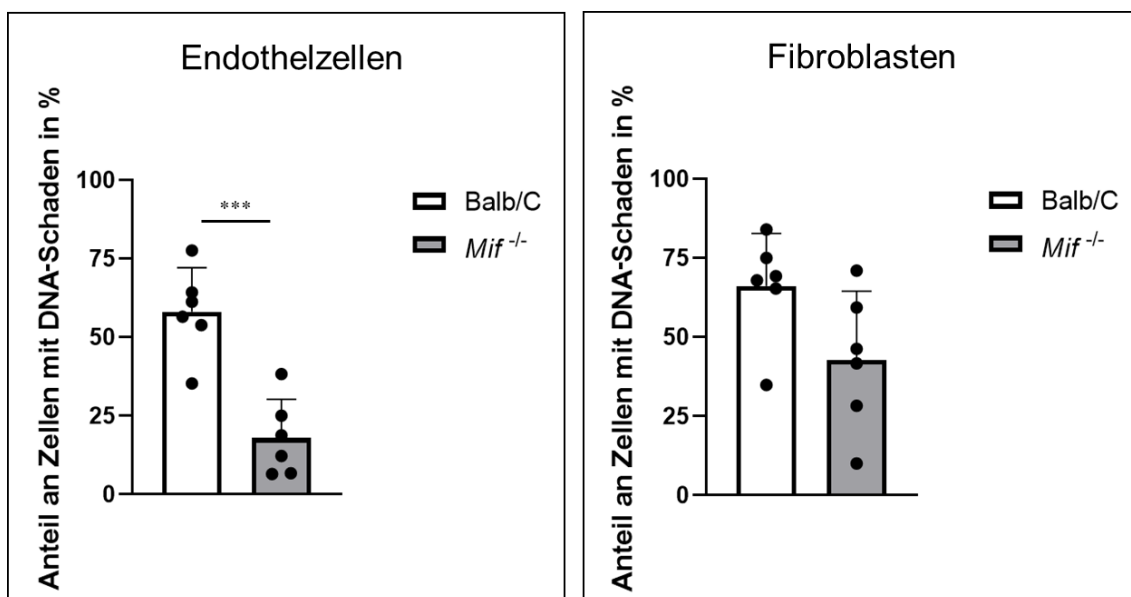


Abb. 17: Anteil an Zellen mit DNA-Schaden innerhalb aller mCMV-infizierten Zellen.

4. Ergebnisse

Kardiale Endothelzellen und Fibroblasten wurden aus dem Herzen adulter Balb/C und *Mif*^{-/-} Mäuse isoliert und für 24 h mit mCherry-mCMV, MOI 1, infiziert. DNA-Schädigung wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung von γ H2A.X detektiert. Der Anteil der Zellen mit DNA-Schaden wurde an der Gesamtzahl aller infizierten Zellen errechnet. n=6, *** p=0,0003

Diese Beobachtung vernachlässigt jedoch die Beeinflussung benachbarter Zellen durch extrazelluläre Kommunikation oder Infektion, bei der noch keine Eigenfluoreszenz von mCMV zu erkennen ist. Daher wurden in einem zweiten Schritt alle Zellen einer infizierten Population, unabhängig vom Infektionsstatus der einzelnen Zelle innerhalb der Population mit mock infizierten Zellen verglichen.

In infizierten Balb/C Endothelzellen wurde ein signifikanter Anstieg an DNA-Schädigung im Vergleich zu mock infizierten Zellen detektiert. Mock infizierte *Mif*^{-/-} Zellen hatten einen vergleichbar geringen Anteil an DNA-Schäden wie mock infizierte Balb/C Zellen. MCMV-infizierte *Mif*^{-/-} Zellen wiesen einen signifikant geringeren Anteil an Zellen mit DNA-Schaden auf als mCMV-infizierte Balb/C Zellen (Abb. 18, links).

Mock infizierte Balb/C und *Mif*^{-/-} Zellen wiesen einen ähnlich geringen Anteil an Zellen mit DNA-Schaden auf, dieser war in *Mif*^{-/-} Zellen noch etwas kleiner. In mCMV-infizierten Balb/C Fibroblasten wurde ein signifikant höherer Anteil an Zellen mit DNA-Schädigung detektiert. Auch in mCMV-infizierten *Mif*^{-/-} Zellen wurde ein signifikant höherer Anteil an geschädigten Fibroblasten gemessen als in mock infizierten Zellen. Im Vergleich von infizierten Balb/C und *Mif*^{-/-} Fibroblasten wiesen *Mif*^{-/-} Zellen einen signifikant geringeren Anteil an Zellen mit DNA-Schädigung auf (Abb. 18, rechts).

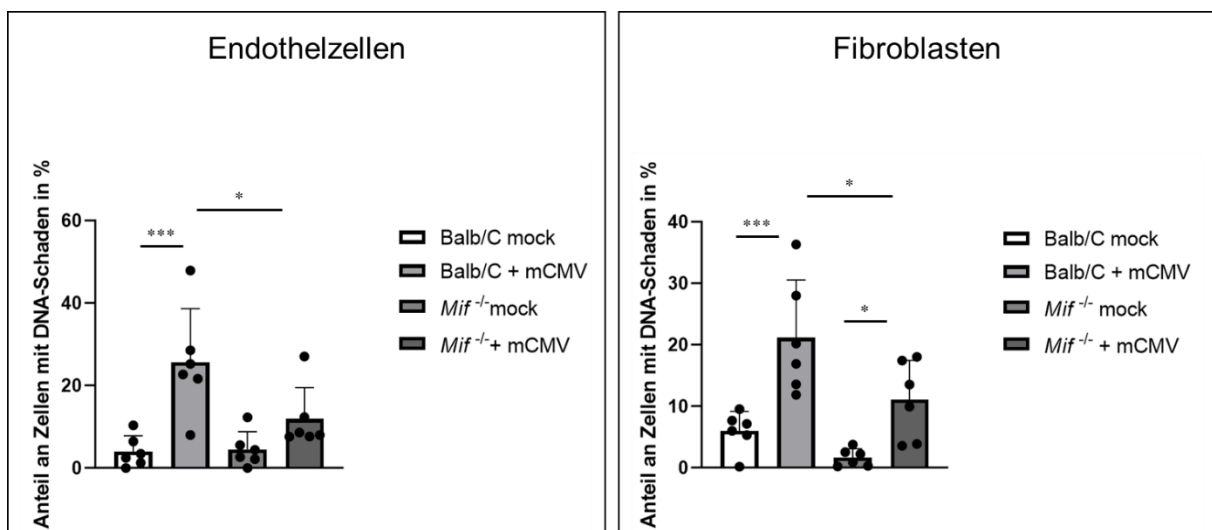


Abb. 18: Anteil an Zellen mit DNA-Schaden innerhalb aller mCMV-infizierten Zellen.

Kardiale Endothelzellen und Fibroblasten wurden aus dem Herzen adulter Balb/C und *Mif*^{-/-} Mäuse isoliert und für 24 h mit mCherry-mCMV, MOI 1, infiziert. DNA-Schädigung wurde mittels

4. Ergebnisse

Immunfluoreszenzmarkierung von γ H2A.X detektiert. Der Anteil der Zellen mit DNA-Schaden wurde von mCMV-infizierten und mock infizierten Zellen errechnet. n=6, * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$

Insgesamt konnte in *Mif*^{-/-} Zellen ein geringerer Anteil an Zellen mit DNA-Schaden beobachtet werden. Im Vergleich von infizierten zu mock infizierten Zellen war dieser Unterschied sowohl in Endothelzellen als auch in Fibroblasten signifikant. MIF hat also einen deutlichen Einfluss auf die DNA-Fragmentierung nach mCMV-Infektion und somit auf den Zelltod. Eine Inhibierung von MIF stellt ein daher einen potenziellen Therapieansatz dar.

5. Diskussion

Eine CMV-Infektion bedeutet ein großes Risiko für immunsupprimierte Patient*innen. Insbesondere im Zuge einer Reaktivierung kann es zu schweren Erkrankungen in verschiedenen Organen, unter anderem im Herzen kommen. Eine Folge kann eine Myokarditis sein, die aktuell nur durch eine toxische CMV-Prophylaxe vorgebeugt werden kann (24). Eine weitere Folge kann die Ausbildung einer Vaskulopathie sein, die neben der Schädigung von Endothelzellen und einer daraus resultierenden Minderdurchblutung des Herzens auch in einer Gewebedestruktion des Herzens resultiert. Die Mechanismen, die letztlich hinter der Herzschildigung nach CMV-Infektion stehen, sind bislang noch nicht ausreichend geklart. Es wurde jedoch gezeigt, dass es im Rahmen der CMV-vermittelten Retinitis in immunsupprimierten Mäusen zum Zelluntergang durch Parthanatose kommt (17, 69). Hierbei handelt es sich um lytischen Zelltodmechanismus, der eine Stimulation des Immunsystems zur Folge haben kann. MIF spielt dabei als Effektorprotein durch seine Nukleaseaktivität eine entscheidende Rolle (49). Die Parthanatose könnte auch in der CMV-vermittelten Herzschildigung insbesondere nach Vaskulopathie oder sogar im Rahmen einer Myokarditis von entscheidender Bedeutung sein.

5.1 CMV infiziert kardiale Zellen

Zuerst wurde untersucht, ob mCMV das Herzgewebe immungeschwächter Mäuse infizieren kann. Hier konnte gezeigt werden, dass mCMV im Herzen von *Stat2*^{-/-} Mäusen zu finden ist (Abb. 4). Da die Herzen blutfrei gespült wurden, ist CMV im Gewebe vorhanden. Weitere Ergebnisse zeigten, dass im Herzgewebe auch der Replikationszyklus gestartet wurde (Abb. 5). In WT Tieren lag der Virustiter unter der Detektionsgrenze. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass mCMV in wildtypischen Balb/C Mäusen über längere Zeit eine Funktionsstörung des Herzens auslöst, die mit Fibrose einhergeht (79). Der hier untersuchte Beobachtungszeitraum lag bei bis zu 50 d p.i. Die Beeinträchtigung des Herzens trat auf, nachdem aktive mCMV-Replikation im Herzen nicht mehr detektiert werden konnte. Womöglich ist dies auch bei den verwendeten 129S2/SvHsd Mäusen der Fall. Hier wurde jedoch nur ein Zeitpunkt von 5 d p.i. untersucht. Die Langzeitfolgen einer CMV-Infektion für das Herz sind somit auch in den wildtypischen Mäusen noch unbekannt.

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass CMV alle kardialen Zelltypen infiziert, die hauptsächlich im Herzgewebe vertreten sind (Abb. 7 und Abb. 8). Diese Erkenntnisse decken sich mit denen aus der Literatur (11). Auch humane kardiale Zellen wurden von hCMV infiziert. In den untersuchten Zellen ließen sich ebenfalls Hinweise für eine aktive Virusreplikation finden. Anhand der Differenzen in der Fluoreszenzintensität verschiedener infizierter Zellen ließ sich schließen, dass nicht nur Zellen durch die einmalige Zugabe von CMV ins

Kulturmedium infiziert wurden, sondern dass infizierte Zellen im weiteren Verlauf Viruspartikel freisetzen und benachbarte Zellen infizieren. Eine Troponinbestimmung im Blutserum infizierter Mäuse erbrachte Hinweise auf eine mögliche Herzschädigung mit Untergang von Kardiomyozyten 4 d p.i. (Abb. 6). Studien zeigen, dass eine CMV-Infektion mit einem höheren Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen verbunden ist (80). Insbesondere die Transplantatvaskulopathie steht in engem Zusammenhang mit einer CMV-Infektion oder Reaktivierung. Ebenso wurde gezeigt, dass CMV den Apoptose- und Nekroptose-Signalweg inhibiert (73). Wodurch entsteht also der Gewebeschaden im Rahmen einer CMV-Infektion oder -Reaktivierung? Eine Möglichkeit wäre die Parthanatose.

5.2 CMV-infizierte Zellen lösen Parthanatose aus

Bei der Parthanatose handelt es sich um einen Caspase-unabhängigen Zelltodmechanismus, der durch die übermäßige Aktivierung von PARP-1 in Gang gesetzt wird. Ein zentrales Merkmal ist also die Synthese von PAR. Besteht nur eine leichte Aktivierung von PARP-1, wird PAR durch den Antagonisten Poly-(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) abgebaut (81). Bei einer Überaktivierung von PARP-1 kann PAR jedoch nicht schnell genug entfernt werden, was im Zelluntergang durch Parthanatose resultiert. PAR lässt sich gut mittels Immunfluoreszenzmarkierung nachweisen. Da während der normalen Zellhomöostase geringe Mengen an PAR entstehen, ist dieses auch in mock infizierten Zellen zu finden. Sowohl in murinen als auch in humanen kardialen Zellen konnte PAR nach einer CMV-Infektion mit starker Fluoreszenzintensität detektiert werden (Abb. 9 und Abb. 10). In mock infizierten und benachbarten Zellen wurde PAR teils nicht oder mit deutlich geringerer Fluoreszenzintensität detektiert. Es findet daher also eine übermäßige Aktivierung von PARP-1 statt, die in einem deutlichen Anstieg von PAR mündet. Dies bedeutet auch einen enormen Energieverlust für die betroffene Zelle, da bei der Synthese von PAR viel NAD⁺ verbraucht wird. Zugleich kommt es zu einer Membrandepolarisation der Mitochondrien, gefolgt von einer erhöhten Durchlässigkeit (82). AIF wird so aus den Mitochondrien freigesetzt und gelangt ins Zytosol, wo es an MIF bindet (49). Die räumliche Annäherung der beiden Interaktionspartner wurde mittels Proximity Ligation Assay nachgewiesen (Abb. 11). Die durchgeführten Kontrollen bestätigten das Signal als spezifisch für die Interaktion von MIF und AIF (Abb. 12). Eine enge räumliche Nähe zweier Proteine bedeutet mit hoher Wahrscheinlichkeit auch eine Protein-Protein-Interaktion, diese kann jedoch nur durch eine Co-Immunopräzipitation eindeutig nachgewiesen werden. In der durchgeführten Co-IP konnte AIF erfolgreich präzipitiert werden, zusätzlich wurde auch MIF mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 13). Die Signalintensität war mit Ausnahme der HCFs in hCMV-infizierten Zellen stärker als in mock infizierten Zellen. Eine MIF/AIF-Interaktion in mock infizierten Zellen kann einerseits mit Stress der Zellen im Vorfeld der Untersuchung durch pH- oder Temperaturschwankungen oder stark verbrauchtem Medium

zusammenhängen. Möglicherweise treten jedoch auch bei der Zellernte und Lyse Schäden an der Zelle auf. Mit den Erkenntnissen des PLAs lässt sich insgesamt jedoch schließen, dass es in CMV-infizierten kardialen Zellen zu einer Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien kommt und eine Bindung von MIF an AIF stattfindet. Diese ist in infizierten Zellen generell stärker vorhanden als in mock infizierten Zellen. Die Lokalisation des Proteinkomplexes ist neben dem Zytosol auch im Bereich des Zellkerns zu vermuten. Signale des PLAs deckten sich teilweise mit dem Signal des Zellkerns. Es ist jedoch auch möglich, dass die detektierten Interaktionssignale aus Fokusebenen knapp über oder unter der aufgenommenen Ebene lagen. In diesem Fall würde das Signal von außerhalb des Zellkerns in den Bereich hineinscheinen. Eine Möglichkeit, dieses Phänomen auszuschließen wäre die Aufnahme eines Z-Stacks, wodurch sich ein 3D-Modell der Zelle rekonstruieren lässt. Dabei werden einzelne Fokusebenen nacheinander aufgenommen, wodurch der Ursprung des Signals einfacher ermittelt werden kann. Eine andere Möglichkeit ist die Untersuchung der beiden Proteine mittels Immunfluoreszenzmarkierung und der Vergleich der jeweiligen Signale miteinander. Im Rahmen der Immunfluoreszenzmarkierung von MIF und AIF ließen sich deutliche Unterschiede in der Lokalisation zwischen CMV-infizierten und mock infizierten Zellen feststellen (Abb. 14 und Abb. 15). Die Fluoreszenzintensitäten für MIF und AIF im Bereich des Zellkerns waren in der beobachteten Fokusebene stark ausgeprägt. In mock infizierten Zellen war teils kein Signal zu erkennen. Diese Beobachtung legt nahe, dass es zu einer Translokation von MIF und AIF in den Zellkern kommt. Somit konnten alle essenziellen Schritte in der Signalkaskade der Parthanatose in CMV-infizierten kardialen Zellen dokumentiert werden. Es besteht dabei kein Unterschied zwischen murinen und humanen Zellen. CMV induziert somit also den Zelluntergang durch Parthanatose im Herzen.

5.3 MIF agiert als Effektorprotein in der Parthanatose

MIF besitzt neben seiner Nukleaseaktivität auch eine Oxidoreduktaseaktivität (83). Es kann daher sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen ausüben. Im Rahmen des akuten Myokardinfarkts konnte einerseits gezeigt werden, dass es in der frühen Phase der Ischämie kardioprotektive Eigenschaften hat (56), eine Inhibition andererseits bei einer Ischämie über 30 min eine Verkleinerung der Infarktgröße bewirkt (58). Ferner korreliert eine erhöhte MIF-Konzentration im Blutplasma mit einer schlechteren Prognose bei Herzinsuffizienz (54). Im Gehirn konnte gezeigt werden, dass MIF in einem murinen Schlaganfallmodell wesentlich zum Untergang von kortikalen Neuronen und einer Verschlechterung der neuronalen Funktion beiträgt (49). Kürzlich wurde die durch MIF vermittelte Parthanatose auch im Rahmen der Parkinson-Erkrankung beschrieben (59). Auch in der CMV-Infektion kardialer Zellen spielt MIF eine bedeutende Rolle. So wiesen MIF-defiziente Zellen nach einer CMV-Infektion einen deutlich geringeren DNA-Schaden auf als wildtypische Zellen (Abb. 16). Nicht nur war der

niedrigere Anteil in CMV-infizierten *Mif*^{-/-} vs. WT-Zellen signifikant, bezog man auch benachbarte (noch) nicht infizierte Zellen ein, konnte diese statistische Signifikanz auch in Fibroblasten beobachtet werden (Abb. 17 und Abb. 18). MIF induziert so in CMV-infizierten kardialen Zellen die DNA-Fragmentierung. Da dies unmittelbare Auswirkungen auf den Zelluntergang hat, führt eine Inhibition von MIF zu einem verbesserten Zellüberleben und somit zu einem geringeren Gewebeschaden des Herzens. Da es während der Parthanatose auch zu einer Aktivierung des Immunsystems kommt, ist so zugleich auch eine Verbesserung der für eine Myokarditis typisch starke Immunreaktion möglich.

5.4 Beurteilung des Projekts

Zusammenfassend ist es gelungen, ein Mausmodell für CMV-Replikation im Herzen bei Immunschwäche zu etablieren. Die vermutete Gewebeschädigung, ausgelöst durch den Zelluntergang durch Parthanatose, muss zukünftig durch eine Wiederholung der Troponinbestimmung im Blutserum mit Proben auch 5 d p.i. validiert werden. Ebenso sollten *Mif*^{-/-} und die entsprechenden WT Balb/C Mäuse in zukünftige Untersuchungen mit einbezogen werden. Da bereits gezeigt wurde, dass Balb/C Tiere anfällig für Fibrose im Herzen nach CMV-Infektion sind, könnte die genetische Deletion von *Mif* positive Auswirkungen auf die Herzfunktion haben.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mCMV das Herzgewebe infiltriert und darin repliziert. Ferner konnte in *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass alle wichtigen kardialen Zelltypen – Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten – anfällig für eine CMV-Infektion sind. Wichtige Abläufe im Signalweg der Parthanatose konnten in kardialen Zellen nach CMV-Infektion nachgewiesen werden: die Synthese von PAR, die Interaktion von MIF und AIF, die Translokation des Proteinkomplexes in den Zellkern und die darauffolgende DNA-Fragmentierung in Abhängigkeit von MIF. Die Parthanatose wurde im Herzen bislang nicht beschrieben. Auch der Zusammenhang von einer CMV-Infektion und der Parthanatose im Herzen war bislang unbekannt. Ebenso konnten durch die Untersuchung humaner kardialer Zellen gezeigt werden, dass die CMV-vermittelte Parthanatose kein rein murines Phänomen ist und so möglicherweise auch bei immunsupprimierten Patient*innen mit CMV-Infektion eine Rolle spielt. Durch die Inhibition von MIF konnte ein Therapieansatz ermittelt werden, der eine mögliche Verbesserung des Krankheitsverlaufs in Aussicht stellt.

5.5 Zukünftige Untersuchungen

Aus den gewonnenen Erkenntnissen lassen sich weitere Fragestellungen und Versuchsstrategien ableiten. Neben der zuvor erwähnten Wiederholung der

Troponinbestimmung im Blutserum sollen zukünftig noch weitere Parameter in Bezug auf die Herzfunktion untersucht werden. Ein weiterer Marker für die Gewebeschädigung ist das *N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide* (NT-proBNP), welches von Kardiomyozyten ausgeschüttet wird, wenn sich die Herzwand z.B. im Zuge einer Herzinsuffizienz zu stark ausdehnt. Eine weitere Möglichkeit, die Pumpfunktion des Herzens nach CMV-Infektion zu überprüfen, ist die Echokardiografie. Hierbei wird mittels Ultraschall die Pumpbewegung und Form des Herzens analysiert. Charakteristisch für eine Myokarditis ist die massive Einwanderung von Immunzellen in das Herzgewebe. Diese könnten mittels Immunhistologie in einem Gewebeschnitt oder im gesamten Organ mittels Light Sheet Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Dies würde das *Stat2*^{-/-} Mausmodell nicht nur als Modell für die CMV-Infektion, sondern auch als Myokarditismodell etablieren.

Auch einige Vorgänge während der Parthanatose sind zurzeit noch ungeklärt. So ist nicht bekannt, auf welche Art AIF aus den Mitochondrien freigesetzt wird. So könnte das Anschwellen der Mitochondrien mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden. Auch die Porenbildung in der mitochondrialen Membran ist noch nicht vollständig untersucht. Die Interaktion von MIF und AIF wurde nur in einem Ansatz mit Hilfe der Co-IP analysiert. Auch hier wäre eine Wiederholung des Versuchs insbesondere mit HCFs von Nutzen. Um auszuschließen, dass eine Interaktion von MIF und AIF während der Zellernte oder Lyse stattfindet, könnte zusätzlich noch eine basale Probe vor der Infektion miteingeschlossen werden.

MIF hat einen Einfluss auf DNA-Schäden nach CMV-Infektion. Es ist jedoch noch nicht klar, wie stark die DNA fragmentiert wird. Eine Gelelektrophorese könnte Auskunft über die Größe der einzelnen Fragmente geben. Diese sind bei einer Fragmentierung im Rahmen der Parthanatose deutlich größer als die im Rahmen der Apoptose (49). Eine weitere Analyse der DNA-Fragmentierung ist der Comet Assay. Hierbei werden Zellen in einem Gel lysiert. Die DNA wandert anschließend durch ein elektrisches Feld, wobei kleinere Fragmente weitere Entfernungen im Gel zurücklegen als größere. Dadurch entsteht bei Begutachtung im Fluoreszenzmikroskop ein Signal, das an einen Kometen erinnert. Anhand des Verhältnisses von Schweiflänge zu Gesamzelllänge lässt sich so der Grad an DNA-Fragmentierung berechnen. Ob die DNA-Fragmentierung durch MIF wirklich zum Zelluntergang führt, lässt sich mit Hilfe einer Lebendzellfärbung herausfinden. Hierbei werden fluoreszierende Farbstoffe verwendet, die je nach Zustand der Zelle an bestimmte Zielstrukturen binden. Der Stoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) bindet beispielsweise an DNA, kann jedoch erst daran binden, wenn die Zelle bereits nicht mehr vital ist und so Zell- und Kernmembran durchlässig werden.

Seit der Entdeckung von MIF als Schlüsselprotein in der Parthanatose wird bereits an einer Möglichkeit zur Inhibierung geforscht. Die genetische Deletion ist eine hervorragende Option im Mausmodell, im klinischen Alltag für Patient*innen jedoch nicht möglich. Es existieren

bereits einige MIF-Inhibitoren, die jedoch z.B. an die Tautomeraseeinheit von MIF binden und nicht oder nur begrenzt Einfluss auf die Parthanatose nehmen. Seit kurzem sind jedoch zwei neue Inhibitoren publiziert. Einer inhibiert gezielt die Endonukleaseaktivität, ohne Einfluss auf die Zytokinfunktion von MIF zu nehmen (59). Ein weiterer Inhibitor verhindert die Bindung von MIF und AIF, sodass MIF nicht in den Zellkern gelangen kann (84). Diese Inhibitoren stellen eine mögliche Therapieoption dar, die auch im klinischen Alltag Verwendung finden könnten. Es wäre daher von Vorteil, diese auch in CMV-infizierten Zellen und Mäusen einzusetzen und zu untersuchen, ob die Parthanatose und somit auch die Herzschädigung verringert werden kann.

Nicht nur CMV kann eine Vaskulopathie oder Myokarditis auslösen. Auch immunkompetente Patient*innen sind betroffen, hier findet sich vorrangig eine Infektion mit Parvovirus B19 oder Enteroviren wie das Coxsackievirus B. Auch das humane Herpesvirus 6 wird häufiger detektiert (21). Auch diese Viren könnten potenziell eine Herzschädigung durch Parthanatose auslösen. Eine Infektion mit Coxsackievirus B in Mäusen ist derzeit das Standardmodell für Myokarditis. Damit existiert bereits eine Grundlage, die Parthanatose im Herzen weiter zu erforschen.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| 129S2/SvHsd | wildtypische Maus des Stammes 129S2/SvHsd |
| AIF | <i>Apoptosis inducing factor</i> |
| ANOVA | <i>analysis of variance</i> ; Varianzanalyse |
| Balb/C | Balb/C wildtypische Maus |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CMV | Zytomegalievirus |
| Co-IP | Co-Immunpräzipitation |
| DAPI | 4',6-Diamino-2-phenylindol |
| d p.i. | <i>days post infection</i> ; Tage nach Infektion |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ddH ₂ O | Bidestilliertes Wasser |
| DMEM | <i>Dulbecco's minimal essential medium</i> ; Dulbeccos Minimalmedium |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung |
| EGFP | <i>Enhanced green fluorescent protein</i> |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> , fötales Kälberserum |
| gDNA | genomische DNA |
| HCAECs | <i>Human coronary artery endothelial cells</i> ; humane kardiale Endothelzellen |
| HCFs | <i>Human cardiac fibroblasts</i> ; humane kardiale Fibroblasten |
| HCl | Salzsäure |
| HCMs | <i>Human cardiomyocytes</i> ; humane Kardiomyozyten |
| hCMV | humanes Zytomegalievirus |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase |
| IE-1 | <i>immediate early protein 1</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| KCl | Kaliumchlorid |

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| KO | <i>knockout</i> ; Ausschalten eines Gens |
| LDS | Lithiumdodecylsulfat |
| mCMV | murines Zytomegalievirus |
| MEFs | <i>mouse embryonic fibroblasts</i> ; embryonale Mausfibroblasten |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| MIF | <i>Macrophage migration inhibitory factor</i> |
| <i>Mif</i> ^{-/-} | MIF defiziente Maus |
| MNCs | <i>mouse newborn cells</i> ; neugeborene Mauszellen |
| MOI | <i>Multiplicity of infection</i> ; Anzahl an Viruspartikeln pro Zelle |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> ; Botenribonukleinsäure |
| n | Anzahl der biologischen Replikate |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaH ₂ PO ₄ • 2 H ₂ O | Natriumdihydrogenphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| OD | optische Dichte |
| PARP-1 | Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PfU | <i>Plaque forming units</i> ; funktionstüchtige Viruspartikel |
| PLA | <i>Proximity ligation assay</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat |
| STAT2 | <i>Signal transducer and activation of transcription factor 2</i> |
| <i>Stat2</i> ^{-/-} | STAT2 defiziente Maus |
| WT | Wildtyp |
| γH2A.X | phosphoryliertes Histon H2AX |

7. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung der Parthanatose. _____ | 6 |
| Abb. 2: Vereinfachte Darstellung des IFN-STAT-Signalwegs. _____ | 8 |
| Abb. 3: Bestimmung der kardialen Troponin I-Konzentration im Blutserum der verwendeten Mauslinien. _____ | 31 |
| Abb. 4: Bestimmung des mCMV Titers in Stat2 ^{-/-} (KO) und WT Mäusen. _____ | 39 |
| Abb. 5: Nachweis der mCMV-Replikation infizierter Stat2 ^{-/-} Mäuse vs. Kontrolltiere 5 d p.i. _____ | 40 |
| Abb. 6: Bestimmung der Troponinkonzentration aus dem Blutserum CMV-infizierter Mäuse 3 und 4 d p.i. _____ | 42 |
| Abb. 7: Untersuchung der mCMV-Infektion in isolierten kardialen Zellen. _____ | 44 |
| Abb. 8: Untersuchung der hCMV-Infektion in kardialen Zellen. _____ | 46 |
| Abb. 9: Detektion von PAR in mCMV-infizierten Zellen. _____ | 48 |
| Abb. 10: Detektion von PAR in hCMV-infizierten Zellen. _____ | 50 |
| Abb. 11: Interaktion von MIF und AIF mittels Proximity Ligation Assay. _____ | 52 |
| Abb. 12: Kontrollansätze des Proximity Ligation Assays. _____ | 53 |
| Abb. 13: Co-Immunopräzipitation von AIF und MIF in humanen kardialen Zellen. _____ | 54 |
| Abb. 14: Lokalisation von MIF und AIF in mCMV-infizierten kardialen Zellen. _____ | 57 |
| Abb. 15: Lokalisation von MIF und AIF in hCMV-infizierten kardialen Zellen. _____ | 59 |
| Abb. 16: Untersuchung der DNA-Fragmentierung durch MIF nach CMV-Infektion. _____ | 60 |
| Abb. 17: Anteil an Zellen mit DNA-Schaden innerhalb aller mCMV-infizierten Zellen. _____ | 60 |
| Abb. 18: Anteil an Zellen mit DNA-Schaden innerhalb aller mCMV-infizierten Zellen. _____ | 61 |

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Materialien mit Herstellerangaben. _____ 12

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien mit Herstellerangaben. _____ 13

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Medien und Lösungen in der Zellkultur mit
Herstellerangaben. _____ 15

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Zelllinien, Maus- und Virusstämme mit
Herstellerangaben. _____ 16

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Färbesubstanzen mit
Herstellerangaben. _____ 17

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Primer _____ 18

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Assays und Kits mit Herstellerangaben. _____ 18

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Geräte und Software mit Herstellerangaben. ____ 19

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen in ihrer Zusammensetzung. 20

9. Literaturverzeichnis

1. Sagar S, Liu PP, Cooper LT, Jr. Myocarditis. *Lancet*. 2012;379(9817):738-47.
2. Cooper LT, Jr. Myocarditis. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1526-38.
3. Griffiths P, Reeves M. Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(12):759-73.
4. Fowler K, Mucha J, Neumann M, Lewandowski W, Kaczanowska M, Grys M, et al. A systematic literature review of the global seroprevalence of cytomegalovirus: possible implications for treatment, screening, and vaccine development. *BMC Public Health*. 2022;22(1):1659.
5. Munro M, Yadavalli T, Fonteh C, Arfeen S, Lobo-Chan AM. Cytomegalovirus Retinitis in HIV and Non-HIV Individuals. *Microorganisms*. 2019;8(1).
6. Kociol RD, Cooper LT, Fang JC, Moslehi JJ, Pang PS, Sabe MA, et al. Recognition and Initial Management of Fulminant Myocarditis: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141(6):e69-e92.
7. Humar A, Lebranchu Y, Vincenti F, Blumberg EA, Punch JD, Limaye AP, et al. The efficacy and safety of 200 days valganciclovir cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2010;10(5):1228-37.
8. Singh N, Winston DJ, Razonable RR, Lyon GM, Silveira FP, Wagener MM, et al. Effect of Preemptive Therapy vs Antiviral Prophylaxis on Cytomegalovirus Disease in Seronegative Liver Transplant Recipients With Seropositive Donors: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020;323(14):1378-87.
9. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet*. 2000;356(9230):645-9.
10. Ruenroengbun N, Numthavaj P, Sapankaew T, Chaiyakittisophon K, Ingsathit A, McKay GJ, et al. Efficacy and safety of conventional antiviral agents in preventive strategies for cytomegalovirus infection after kidney transplantation: a systematic review and network meta-analysis. *Transpl Int*. 2021;34(12):2720-34.
11. Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;325:63-83.
12. Isaacson MK, Juckem LK, Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;325:85-100.
13. Li T, Chen J, Cristea IM. Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion. *Cell Host Microbe*. 2013;14(5):591-9.
14. Jean Beltran PM, Cristea IM. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(6):697-711.

15. Alwine JC. The human cytomegalovirus assembly compartment: a masterpiece of viral manipulation of cellular processes that facilitates assembly and egress. *PLoS Pathog.* 2012;8(9):e1002878.
16. Das S, Pellett PE. Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. *J Virol.* 2011;85(12):5864-79.
17. Oh JJ, Carter JJ, Nemeny JGE, Dix RD. Parthanatos-associated proteins are stimulated intraocularly during development of experimental murine cytomegalovirus retinitis in mice with retrovirus-induced immunosuppression. *J Med Virol.* 2020;92(3):394-8.
18. Golpour A, Patriki D, Hanson PJ, McManus B, Heidecker B. Epidemiological Impact of Myocarditis. *J Clin Med.* 2021;10(4).
19. Ammirati E, Cipriani M, Moro C, Raineri C, Pini D, Sormani P, et al. Clinical Presentation and Outcome in a Contemporary Cohort of Patients With Acute Myocarditis: Multicenter Lombardy Registry. *Circulation.* 2018;138(11):1088-99.
20. Ammirati E, Veronese G, Brambatti M, Merlo M, Cipriani M, Potena L, et al. Fulminant Versus Acute Nonfulminant Myocarditis in Patients With Left Ventricular Systolic Dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(3):299-311.
21. Tschope C, Ammirati E, Bozkurt B, Caforio ALP, Cooper LT, Felix SB, et al. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: current evidence and future directions. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(3):169-93.
22. Caforio ALP, Adler Y, Agostini C, Allanore Y, Anastasakis A, Arad M, et al. Diagnosis and management of myocardial involvement in systemic immune-mediated diseases: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Disease. *Eur Heart J.* 2017;38(35):2649-62.
23. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2005;111(7):887-93.
24. Scherger S, Mathur S, Bajrovic V, Johnson SC, Benamu E, Ramanan P, et al. Cytomegalovirus myocarditis in solid organ transplant recipients: A case series and review of literature. *Transpl Infect Dis.* 2020;22(3):e13282.
25. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 2007;17(4):253-76.
26. Heymans S, Eriksson U, Lehtonen J, Cooper LT, Jr. The Quest for New Approaches in Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2016;68(21):2348-64.
27. Huang CH, Vallejo JG, Kollias G, Mann DL. Role of the innate immune system in acute viral myocarditis. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(3):228-37.

28. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2012;33(14):1787-847.
29. Frey N, Meder B, Katus HA. Left Ventricular Biopsy in the Diagnosis of Myocardial Diseases. *Circulation.* 2018;137(10):993-5.
30. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2007;28(24):3076-93.
31. Klimczak-Tomaniak D, Roest S, Brugts JJ, Caliskan K, Kardys I, Zijlstra F, et al. The Association Between Cytomegalovirus Infection and Cardiac Allograft Vasculopathy in the Era of Antiviral Valganciclovir Prophylaxis. *Transplantation.* 2020;104(7):1508-18.
32. Gao SZ, Schroeder JS, Alderman EL, Hunt SA, Valantine HA, Wiederhold V, et al. Prevalence of accelerated coronary artery disease in heart transplant survivors. Comparison of cyclosporine and azathioprine regimens. *Circulation.* 1989;80(5 Pt 2):III100-5.
33. Lund LH, Khush KK, Cherikh WS, Goldfarb S, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report-2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant.* 2017;36(10):1037-46.
34. Langstraat M, Musters KJS, Manintveld O, Masetti M, Potena L. Coronary artery disease in heart transplantation: new concepts for an old disease. *Transpl Int.* 2018;31(8):787-827.
35. Potena L, Grigioni F, Ortolani P, Magnani G, Marrozzini C, Falchetti E, et al. Relevance of cytomegalovirus infection and coronary-artery remodeling in the first year after heart transplantation: a prospective three-dimensional intravascular ultrasound study. *Transplantation.* 2003;75(6):839-43.
36. Nakano SM, Toshihiro; Nishimura, Shigeyuki; Senbonmatsu, Takaaki. *Cardiomyocyte and Heart Failure. Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues - From Molecules to Humans.* 2012.
37. Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, Eulderink F. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J.* 1991;12(4):488-94.

38. Ogata T, Yamasaki Y. High-resolution scanning electron microscopic studies on the three-dimensional structure of the transverse-axial tubular system, sarcoplasmic reticulum and intercalated disc of the rat myocardium. *Anat Rec.* 1990;228(3):277-87.
39. Kolwicz SC, Jr., Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2013;113(5):603-16.
40. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res.* 2016;118(3):400-9.
41. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007;100(2):158-73.
42. Caulfield JB, Borg TK. The collagen network of the heart. *Lab Invest.* 1979;40(3):364-72.
43. Tallquist MD, Molkenin JD. Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(8):484-91.
44. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, et al. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation.* 1986;74(4):693-702.
45. David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14(3):1116-28.
46. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-20.
47. Murata MM, Kong X, Moncada E, Chen Y, Imamura H, Wang P, et al. NAD⁺ consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival. *Mol Biol Cell.* 2019;30(20):2584-97.
48. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, et al. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18314-9.
49. Wang Y, An R, Umanah GK, Park H, Nambiar K, Eacker SM, et al. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Science.* 2016;354(6308).
50. Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research.* 2000;10(3):205-11.
51. Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders HJ. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):759-67.
52. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.* 1966;153(3731):80-2.

53. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. 1995;377(6544):68-71.
54. Luedike P, Alatzides G, Papathanasiou M, Heisler M, Pohl J, Lehmann N, et al. Circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) in patients with heart failure. *Cytokine*. 2018;110:104-9.
55. Miller EJ, Li J, Leng L, McDonald C, Atsumi T, Bucala R, et al. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature*. 2008;451(7178):578-82.
56. Luedike P, Hendgen-Cotta UB, Sobierajski J, Totzeck M, Reeh M, Dewor M, et al. Cardioprotection through S-nitros(yl)ation of macrophage migration inhibitory factor. *Circulation*. 2012;125(15):1880-9.
57. Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeiffer U, Knarren S, Roller M, et al. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(3):380-5.
58. Gao XM, Liu Y, White D, Su Y, Drew BG, Bruce CR, et al. Deletion of macrophage migration inhibitory factor protects the heart from severe ischemia-reperfusion injury: a predominant role of anti-inflammation. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(6):991-9.
59. Park H, Kam TI, Peng H, Chou SC, Mehrabani-Tabari AA, Song JJ, et al. PAAN/MIF nuclease inhibition prevents neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*. 2022;185(11):1943-59 e21.
60. Trilling M, Bellora N, Rutkowski AJ, de Graaf M, Dickinson P, Robertson K, et al. Deciphering the modulation of gene expression by type I and II interferons combining 4sU-tagging, translational arrest and in silico promoter analysis. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(17):8107-25.
61. Baranek T, Manh TP, Alexandre Y, Maqbool MA, Cabeza JZ, Tomasello E, et al. Differential responses of immune cells to type I interferon contribute to host resistance to viral infection. *Cell Host Microbe*. 2012;12(4):571-84.
62. Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994;264(5164):1415-21.
63. Hambleton S, Goodbourn S, Young DF, Dickinson P, Mohamad SM, Valappil M, et al. STAT2 deficiency and susceptibility to viral illness in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(8):3053-8.
64. Le-Trilling VTK, Wohlgemuth K, Ruckborn MU, Jagnjic A, Maassen F, Timmer L, et al. STAT2-Dependent Immune Responses Ensure Host Survival despite the Presence of a Potent Viral Antagonist. *J Virol*. 2018;92(14).

65. Blaszczyk K, Nowicka H, Kostyrko K, Antonczyk A, Wesoly J, Bluysen HA. The unique role of STAT2 in constitutive and IFN-induced transcription and antiviral responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;29:71-81.
66. Corrado D, Basso C, Thiene G. Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc Res.* 2001;50(2):399-408.
67. Baksi AJ, Kanaganayagam GS, Prasad SK. Arrhythmias in viral myocarditis and pericarditis. *Card Electrophysiol Clin.* 2015;7(2):269-81.
68. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(8):891-975.
69. Oh JJ, Carter JJ, Dix RD. A Mouse Model That Mimics AIDS-Related Cytomegalovirus Retinitis: Insights into Pathogenesis. *Pathogens.* 2021;10(7).
70. Schupp AK, Trilling M, Rattay S, Le-Trilling VTK, Haselow K, Stindt J, et al. Bile Acids Act as Soluble Host Restriction Factors Limiting Cytomegalovirus Replication in Hepatocytes. *J Virol.* 2016;90(15):6686-98.
71. Ackers-Johnson M, Li PY, Holmes AP, O'Brien SM, Pavlovic D, Foo RS. A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes From the Adult Mouse Heart. *Circ Res.* 2016;119(8):909-20.
72. Le-Trilling VT, Trilling M. Mouse newborn cells allow highly productive mouse cytomegalovirus replication, constituting a novel convenient primary cell culture system. *PLoS One.* 2017;12(3):e0174695.
73. Yadav SK, Gawargi FI, Hasan MH, Tandon R, Upton JW, Mishra PK. Differential effects of CMV infection on the viability of cardiac cells. *Cell Death Discov.* 2023;9(1):111.
74. Kuan MI, Caruso LB, Zavala AG, Rana P, O'Dowd JM, Tempera I, et al. Human Cytomegalovirus Utilizes Multiple Viral Proteins to Regulate the Basement Membrane Protein Nidogen 1. *J Virol.* 2022;96(20):e0133622.
75. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(10):610-21.
76. Alam MS. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol.* 2018;123(1):e58.
77. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 1998;273(10):5858-68.
78. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 2008;22(3):305-9.

79. Bonavita CM, White TM, Francis J, Cardin RD. Heart Dysfunction Following Long-Term Murine Cytomegalovirus Infection: Fibrosis, Hypertrophy, and Tachycardia. *Viral Immunol.* 2020;33(3):237-45.
80. Wang H, Peng G, Bai J, He B, Huang K, Hu X, et al. Cytomegalovirus Infection and Relative Risk of Cardiovascular Disease (Ischemic Heart Disease, Stroke, and Cardiovascular Death): A Meta-Analysis of Prospective Studies Up to 2016. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(7).
81. Burns DM, Ying W, Kauppinen TM, Zhu K, Swanson RA. Selective down-regulation of nuclear poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *PLoS One.* 2009;4(3):e4896.
82. Alano CC, Ying W, Swanson RA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD⁺ depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 2004;279(18):18895-902.
83. Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, et al. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol.* 1998;280(1):85-102.
84. Chen D, Osipyan A, Adriana J, Kader M, Gureev M, Knol CWJ, et al. Allosteric Inhibitors of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Interfere with Apoptosis-Inducing Factor (AIF) Co-Localization to Prevent Parthanatos. *J Med Chem.* 2023;66(13):8767-81.

Danksagung

Gefühlt habe ich gerade erst mit der Promotion zu Beginn der Covid19-Pandemie begonnen, schon sind über drei Jahre vergangen und ich kann auf eine spannende und sehr bereichernde Zeit zurückblicken.

Ganz besonders dankbar bin ich dafür, dass ich meine Masterarbeit zur Untersuchung der Parthanatose im Herzen in den CardioScienceLabs fortführen konnte. Dies wäre ohne die finanzielle Unterstützung der Jürgen Manchot Stiftung im Rahmen eines Promotionsstipendiums nicht möglich gewesen. Ebenso danke ich der Universitätsmedizin Essen und insbesondere der Klinik für Kardiologie und Angiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Tienush Rassaf für die Unterstützung nach Auslauf meines Stipendiums.

Prof. Dr. Rassaf möchte ich ebenso für die Begeisterung an meiner Arbeit, Ideen und Anmerkungen danken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Peter Lüdike für die tatkräftige Unterstützung, die Begeisterung für das Thema CMV-Infektion im Herzen und vor allem für alle möglichen Hintergründe aus dem klinischen Alltag. Vielen Dank für all unsere Diskussionen und Gespräche, aber auch für die Freiheit mich selbst zu entfalten. Ebenso bedanke ich mich für die Möglichkeit, mein Projekt bei der DGK Jahrestagung 2022 vorstellen zu dürfen.

Prof. Dr. Ulrike Hendgen-Cotta danke ich ebenfalls ganz herzlich für die tagtägliche Unterstützung im Labor, ihr immenses Wissen vor allem bei methodischen Fragen und das immer offene Ohr für Probleme oder Fragen. Ihre Begeisterung für sämtliche biologischen Prozesse in der Kardiologie ist so ansteckend, dass es nicht verwunderlich ist, dass ich seit Beginn meines Masterstudiums als studentische Hilfskraft bis heute mit viel Spaß und Interesse in den CardioScienceLabs arbeite.

Ein besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mirko Trilling, insbesondere auch Dr. Khanh Le-Trilling, für die großartige Zusammenarbeit und die Beantwortung all meiner Fragen rund um das Thema CMV, für die Möglichkeit der Arbeit im Labor und auch für die Anregung, mein Projekt beim 15. Mini-Herpesvirusworkshop vorzustellen.

Natürlich wäre Vieles ohne die alltägliche Unterstützung meiner Kolleginnen und Kollegen im Labor nicht nötig gewesen. Ich bedanke mich daher ganz herzlich bei Pia Stock, Andrea Odersky, Christoph Jesenek, Dr. Shah Bahrullah Shah, Dr. Hannah Döpfer, Dr. Anna Beerlage, Dr. Martin Heisler, Dr. Stephan Settelmeier, Dr. Sebastian Korste, Dr. Elias Haj-Yehia, Nina Dietzel und allen anderen Mitgliedern des CardioScienceLabs. Ein großer Dank geht auch an Benjamin Katschinski und Kerstin von Ameln aus der Arbeitsgruppe Trilling.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Partner Hassan Habach und meinen Eltern Doris und Uwe Roth bedanken. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung wäre ich nie so weit

Danksagung

gekommen. Danke für eure Liebe und eure Ermutigung und euren immerwährenden Beistand. Ihr habt mir ermöglicht, meinen Weg zu gehen.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Anna Roth

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Anna Roth

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchung zur CMV-assoziierten Rolle des *Macrophage Migration Inhibitory Factor* in der myokardialen Parthanatose“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Anna Roth befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Name des Mitglieds der Universität Duisburg-Essen in Druckbuchstaben

Essen, den _____