

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

**Etablierung und Evaluierung eines  
Mikroneutralisationstests mit Trophoblasten-  
Primärkulturen zur Abschätzung des  
HCMV-Transmissionsrisikos bei  
maternaler Primärinfektion**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Sonja Michaela Geiger  
aus  
Stuttgart

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jahn

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Klingel

Meinem Vater und meiner Mutter gewidmet

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung .....</b>  | <b>7</b>  |
| 1.1      | Biologie und Molekularbiologie des humanen Cytomegalovirus (HCMV) .....  | 7         |
| 1.1.1    | Taxonomie .....  | 7         |
| 1.1.2    | Virion- und Genomstruktur .....  | 7         |
| 1.1.3    | Viraler Infektionszyklus und Morphogenese .....                          | 9         |
| 1.2      | Klinische Bedeutung und Epidemiologie der HCMV-Infektion .....           | 11        |
| 1.3      | Immunantwort und virale Pathogenitätsfaktoren .....                      | 13        |
| 1.4      | Die kongenitale HCMV-Infektion .....                                     | 17        |
| 1.4.1    | Ursachen und Häufigkeit der kongenitalen HCMV-Infektion .....            | 17        |
| 1.4.2    | Klinik der kongenitalen HCMV-Infektion .....                             | 20        |
| 1.4.3    | Therapie und Prophylaxe .....  | 21        |
| 1.5      | Diagnose und Risikoabschätzung der kongenitalen HCMV-Infektion .....     | 22        |
| 1.6      | Diaplazentare Infektionsübertragung .....                                | 25        |
| 1.6.1    | Bau und Funktion der menschlichen Plazenta .....                         | 25        |
| 1.6.2    | Plazentare Infektion und intrauterine Transmission von HCMV .....        | 26        |
| 1.7      | Zielsetzung der Arbeit .....   | 30        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden .....</b>                                       | <b>32</b> |
| 2.1      | Untersuchungsmaterial .....  | 32        |
| 2.1.1    | HCMV-Immunsereen .....   | 32        |
| 2.1.1.1  | Charakteristika der Serumproben HCMV-primärinfizierter Schwangerer ..... | 32        |
| 2.1.2    | Zelllinien und Virusstamm .....  | 35        |
| 2.1.3    | Antikörper und Zellmarker .....  | 36        |
| 2.1.4    | Reagenzien .....   | 37        |
| 2.1.5    | Geräte .....   | 38        |
| 2.1.6    | Sonstiges .....  | 38        |
| 2.2      | Methoden .....   | 39        |
| 2.2.1    | Trophoblasten-Isolierung .....   | 39        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.2.2    | Zellkultur .....  | 42        |
| 2.2.2.1  | Kultur von villösen Trophoblasten .....   | 42        |
| 2.2.2.2  | Kultur von humanen Vorhautfibroblasten (HFF) .....  | 42        |
| 2.2.2.3  | Kultur von AC-1M88 .....  | 43        |
| 2.2.2.4  | Kultur von HPEC-A1 .....  | 43        |
| 2.2.3    | Virusanzucht und Virustitration .....   | 43        |
| 2.2.3.1  | Virusanzucht .....  | 43        |
| 2.2.3.2  | Anlegen von Virusstocks und Virustitration .....  | 44        |
| 2.2.4    | Bestimmung der Neutralisationskapazität durch einen<br>Mikroneutralisationstest .....                         | 44        |
| 2.2.4.1  | Probenvorbereitung .....  | 45        |
| 2.2.4.2  | Infektion der Zellen .....  | 46        |
| 2.2.4.3  | Fixierung und Permeabilisierung .....   | 46        |
| 2.2.5    | Immunzytochemische Färbung .....  | 46        |
| 2.2.5.1  | Immunzytochemische Färbung viraler Antigene .....   | 46        |
| 2.2.5.2  | Immunzytochemische Färbung zellulärer Antigene .....  | 48        |
| 2.2.6    | ELISA zum Nachweis HCMV-infizierter Zellen .....  | 48        |
| 2.2.6.1  | Rechnerische Auswertung und graphische Darstellung .....  | 49        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>50</b> |
| 3.1      | Methodenetablierung einer Trophoblasten-Primärkultur für HCMV-<br>Infektionsstudien .....                     | 50        |
| 3.1.1    | Trophoblastenisolierung und –Primärkultur .....   | 50        |
| 3.1.2    | Untersuchung der HCMV-Antigenkinetik von HCMV-infizierten<br>Trophoblasten-Primärkulturen .....               | 54        |
| 3.2      | Etablierung eines ELISA-basierten Mikroneutralisationstests für<br>plazentare Zelllinien .....                | 55        |
| 3.2.1    | Optimierung und Standardisierung von Voraussetzungen und Ablauf<br>des Mikroneutralisationstests .....        | 56        |
| 3.2.2    | Etablierung und Optimierung des ELISA .....   | 57        |
| 3.2.3    | NT-Testung von Seren mit unterschiedlichem HCMV-Status unter<br>Verwendung der verschiedenen Zelllinien ..... | 61        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.2.4    | Vergleich der herkömmlich gemessenen NT-Titer und Messung der Neutralisationskapazität im ELISA .....  | 62         |
| 3.2.5    | Reproduzierbarkeit des Mikroneutralisationstests .....   | 63         |
| 3.3      | Untersuchung des Neutralisationseffektes von Seren primärinfizierter Schwangerer auf die HCMV-Infektion von placentaren Zellen und HFF ..... | 65         |
| 3.4      | Vergleich der NT-Antikörperprofile von Transmittern und Non-Transmittern bei HCMV-Primärinfektion in der Schwangerschaft .....               | 67         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>70</b>  |
| 4.1      | Entwicklung eines Trophoblasten-Zellkulturmodells für HCMV-Infektionsstudien .....   | 70         |
| 4.1.1    | Methodenetablierung zur Isolierung und Kultivierung von Trophoblasten aus Term-Plazenten .....   | 71         |
| 4.1.2    | Permissive HCMV-Infektion von Trophoblasten-Primärkulturen .....   | 78         |
| 4.2      | Entwicklung eines ELISA-basierten Mikroneutralisationstest für placentare Zelllinien .....   | 82         |
| 4.3      | Vergleich der NT-Titer-Profile von HCMV-Antiseren bei Testung mit HFF und placentaren Zelllinien .....                                       | 86         |
| 4.4      | Bedeutung der NT-Antikörperantwort für die vertikale Transmission .  | 88         |
| 4.5      | Korrelation von NT-Titerhöhe und Transmissionsrisiko im Trophoblasten-NT-Test .....  | 91         |
| 4.6      | Bedeutung eines organtypischen Zellkulturmodells für die Risikoabschätzung einer kongenitalen HCMV-Infektion .....                           | 95         |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>   | <b>97</b>  |
| <b>6</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>99</b>  |
| <b>7</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>101</b> |

# **1 Einleitung**

## **1.1 Biologie und Molekularbiologie des humanen Cytomegalovirus (HCMV)**

### **1.1.1 Taxonomie**

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) gehört aufgrund der charakteristischen Architektur des Virions zur Herpesvirusfamilie (Roizmann et al. 1992). Bislang sind acht verschiedene humanpathogene Viren der mehr als 100 Spezies umfassenden Virusfamilie bekannt. Die Herpesviren lassen sich aufgrund spezifischer Eigenschaften wie Pathogenität, Wirtsspektrum, Replikationszyklus, Zytopathologie und Zelltropismus in drei Unterfamilien einteilen: die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Herpesviren (Roizmann et al. 1981). Das HCMV (HHV 5) bildet mit den humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV 6 und HHV 7) die Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren. Sie weisen in vivo und in vitro eine strikte Wirtsspezifität auf, durchlaufen in vitro einen langsamen Replikationszyklus (Roizmann et al. 1981, Stinski 1983, Ho 1991) und führen zur Vergrößerung infizierter Zellen, was sich in der Namensgebung des Cytomegalovirus wiederfindet. Ein Kennzeichen aller Herpesviren ist die Fähigkeit, nach einer oftmals symptomlosen Erstinfektion in den Zustand der Latenz überzugehen und lebenslang im Wirt zu verbleiben. Die Latenz ist als reversible, nicht-produktive Infektion einer Wirtszelle mit einem replikationskompetenten Virus definiert (Roizmann et al. 1996). Die Fähigkeit zur Latenz setzt voraus, dass ein Virus der Immunabwehr entkommen kann (Reddehase 2002) und sein Genom in der latent infizierten Zelle persistiert.

### **1.1.2 Virion- und Genomstruktur**

Als umhülltes Virus mit doppelsträngiger DNA als Genom zeigt HCMV die typischen Strukturmerkmale eines Herpesvirus. Im Inneren liegt das Virus-Core, eine fibrilläre Proteinmatrix, welche die lineare doppelsträngige DNA enthält. Das Core wird von einem aus 162 Kapsomeren bestehenden ikosaedrischen

Kapsid umgeben. Kern und Kapsid bilden zusammen das Nukleokapsid, welches in eine amorphe Proteinmatrix, die fast ausschließlich aus Phosphoproteinen (pp) besteht, eingebettet ist. Diese Matrix wird als Tegument bezeichnet. Einigen Tegumentproteinen wird eine regulatorische Funktion während der Frühphase des Replikationszyklus zugeschrieben. Das Tegumentprotein pp71 (UL82) induziert als Transaktivator (Liu & Stinski 1992) die Expression von immediate early (IE) Genen, also der Gene, die als erste nach der Infektion exprimiert werden. Dem Tegumentprotein pp65 (UL83) wird die Funktion einer Proteinkinase zugeschrieben (Britt & Auger 1986, Roby & Gibson 1986, Gallina et al. 1999). Beide Proteine werden zudem als wichtige Antigene für die T-Zell Aktivierung angesehen (Ridell & Greenberg 1995). Auch das Tegumentprotein pp150 hat starke immunogene Eigenschaften (Jahn et al. 1987, Gibson 1996). Dem Tegument liegt außen die Virushülle (envelope) an, eine Lipid-Doppelschicht, die sich von Vesikeln des Golgi-Apparates ableitet (Tooze et al. 1993) und in die sowohl zelluläre als auch virale Glykoproteine eingelagert sind. Die Glykoproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Adsorption des Virus an Zellrezeptoren, bei der Penetration und Aufnahme der Partikel in die Zelle (Keay & Baldwin 1991, Compton et al. 1993, Navarro et al. 1993, Bold et al. 1996, Tuzigov et al. 1996, Tuzigov et al. 1998) sowie bei der Induktion einer neutralisierenden Immunantwort (Britt & Mach 1996).

Mit ca. 230 Kilobasenpaaren (kbp) Länge und einer Kodierungskapazität von etwa 200 Leserahmen gehört das HCMV-Genom zu den größten viralen Genomen. Von allen humanpathogenen Herpesviren besitzt HCMV das größte Genom. Es konnte gezeigt werden, dass von den über 160 viralen Genen zwischen 45 und 57 essentiell für die virale Replikation sind. Ebenso besitzt HCMV Gene, die für die Virusreplikation nicht essentiell sind. Viele dieser Genprodukte modulieren die zelluläre Immunantwort (Mocarski 2004). Die lineare doppelsträngige DNA besteht aus zwei unterschiedlich langen Segmenten einmalig vorkommender Sequenzen, der Unique-long- ( $U_L$ -) und der Unique-short- ( $U_S$ -) Region, die jeweils von intern oder terminal angeordneten repetitiven Sequenzen flankiert sind. Die  $U_L$ - und  $U_S$ -Untereinheiten können während der Replikation invertieren, so dass vier



isomere Varianten möglich sind. Diese vier Genom-Isomere werden in äquimolaren Verteilungen in jeder Viruspopulation gefunden (Oram et al. 1982). Das komplett sequenzierte Genom des Laborstammes AD169 enthält die Information für über 160 Genprodukte, von denen viele bislang nicht näher charakterisiert sind (Chee et al. 1990, Jahn & Mach 1990, Davison et al. 2003). Gegenüber Laborstämmen haben klinische Isolate ein um 15 kbp größeres Genom mit 19 offenen Leserahmen (ORF) für potentielle Glykoproteine (Ramirez et al. 1979, Stinski et al. 1979, Cha et al. 1996). Es gibt Hinweise, dass sich diese Genomdifferenz unter anderem in Unterschieden in Pathogenität und Zelltropismus der verschiedenen Virusstämme äußert (Klein et al. 1999, MacCormac & Grundy 1999). So führen die Laborstämme AD169 und Towne zwar zur Serokonversion, nicht jedoch zu klinischen Symptomen (Elek & Stern 1974, Plotkin et al. 1976, Plotkin et al. 1984).

### **1.1.3 Viraler Infektionszyklus und Morphogenese**

HCMV repliziert in Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen ebenso wie in Zellen epithelialen Ursprungs, glatten Muskelzellen und Hepatozyten und zeigt damit einen breiten Zelltropismus (Sinzger et al. 1995, Sinzger et al. 1996, Sinzger & Jahn 1996, Plachter et al. 1996). CD<sub>34</sub>-positive Vorläuferzellen des Knochenmarks, Monozyten und Epithelzellen werden als Ort der Latenz diskutiert (Sinclair & Sissons 2006).

Durch Anlagerung des Virus an die Wirtszelle, möglicherweise durch unspezifische Bindung an Oberflächenmoleküle wie Heparansulfat-Proteoglykane (Kari et al. 1992, Compton et al. 1993), wird die Interaktion mit virusspezifischen zellulären Rezeptoren ermöglicht. Adsorption, Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran und Penetration des Virus werden hierbei durch virale Glykoproteine vermittelt. Gegen diese Proteine gerichtete Antikörper können infektiöses Virus neutralisieren (Rasmussen 1990; Keay & Baldwin 1991, Britt & Mach 1996). Die eingeschleusten Nukleokapside gelangen vermutlich analog zu Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1) durch Dynein-vermittelten Transport entlang der Mikrotubuli zum Zellkern (Sodeik et al. 1996).

Nach Bindung der Kapside an Kernporen wird das Genom ins Nukleoplasma abgegeben (Ojala et al. 2000) und dort zirkularisiert. Eine Infektion ist andererseits auch durch das Verschmelzen der Membranen infizierter Zellen mit denjenigen nichtinfizierter Zellen möglich. Auf diese Art werden die Kapside von Zelle zu Zelle weitergegeben (Mokarski 1993, Modrow 1997).

Die Transkription und Expression der viralen Gene läuft kaskadenartig in drei Stufen ab; entsprechend werden drei Kategorien von Genen, Genprodukten und Replikationsvorgängen unterschieden. Sie werden mit immediate early (IE), early (E) und late (L) bezeichnet (Wathen & Stinski 1982, Honess & Roizman 1974). Für die Transkription der Gene der sehr frühen Phase (IE), die innerhalb der ersten 4 Stunden nach Infektion abläuft, ist eine de novo Synthese viraler Proteine nicht notwendig (Stinski et al. 1983, Stinski et al. 1991). Die IE-Proteine haben regulatorische Funktionen, die dem Virus die Kontrolle über die Wirtszelle ermöglichen, und einige werden zur Aktivierung der frühen (E) Gene benötigt. Die Gene der frühen Phase kodieren für eine Vielzahl von Proteinen, die für die Replikation des viralen Genoms nötig sind, einschließlich der viralen DNA-Polymerase (Britt 1996, Mocarski & Courcelle 2001). Mit der viralen DNA-Synthese beginnt die späte (L) Phase, in der 24 - 72 h nach Infektion späte Strukturgenprodukte synthetisiert werden, die für den Zusammenbau und die Virusausschleusung bedeutend sind. In vivo kann die Dynamik und Kinetik der Virusvermehrung sehr hoch sein, wie Studien mittels quantitativer PCR gezeigt haben (Emery et al. 1999). Die Morphogenese der Tochtervirionen beginnt mit dem Zusammenbau zu Partikelvorstufen im Zellkern (Gibson et al. 1993, Steven 1997, Roizmann 2001). Über mehrere Zwischenstufen werden im Zytoplasma infektiöse Virionen gebildet (Sanchez et al. 2000a, Sanchez et al. 2000b), die über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche gelangen, wo ihre Freisetzung erfolgt (Eggers et al. 1992, Tooze et al. 1993, Gibson 1996).

## **1.2 Klinische Bedeutung und Epidemiologie der HCMV-Infektion**

Weltweit infizieren sich durchschnittlich 80% aller Menschen im Laufe ihres Lebens mit HCMV (Ho 1991), wobei die Seropositivitätsrate große demographische Unterschiede zeigt.

Aufgrund der Fähigkeit des Virus, nach einer Primärinfektion lebenslang latent im Wirtsorganismus zu persistieren, kann es zur Reaktivierung kommen (Hamilton 1982, Drew & Lalezari 1999, Mocarski & Courcelle 2001). Durch die Diversität verschiedener HCMV-Virusstämme treten aber auch Reinfektionen auf (Alford 1993). Der Infektionsverlauf ist von der Kontrolle durch das Immunsystem des infizierten Individuums abhängig. Beim immunkompetenten Menschen verläuft die Infektion meistens symptomlos oder symptomarm. Gelegentlich treten katarrhalische Symptome oder das klinische Bild einer infektiösen Mononukleose mit Fieber, Lymphadenopathie und Hepatitis auf (Mertens et al. 1994).

Klinische Bedeutung hat die HCMV-Infektion bei immunsupprimierten Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantation, bei der HIV-Erkrankung sowie in der Schwangerschaft. Das Virus gehört zu den häufigsten Erregern opportunistischer Erkrankungen (Griffiths 2002), wobei die Krankheitsbilder sowohl bei einer Primärinfektion als auch im Falle einer Reaktivierung abhängig von Art und Ausmaß der Immunsuppression sind. HCMV-Manifestationen wie Retinitis, Enzephalitis, Pneumonie, Hepatitis und gastrointestinale Symptome sind mit einer hohen Morbidität oder Mortalität verbunden (Boeck & Bowden 1995, Ljungman 1996). Die durch HCMV verursachte interstitielle Pneumonie gehört zu den häufigsten Todesursachen bei Risikopatienten (Macher et al. 1983, Ljungman et al. 1994). Bei Empfängern solider Organe korreliert die HCMV-Infektion zudem mit Dysfunktion und Abstoßung des transplantierten Organs (Grattan et al. 1989, Britt 1996). Schwerwiegende HCMV-Erkrankungen können sich aber auch pränatal manifestieren, wenn das Immunsystem des Feten noch nicht ausreichend entwickelt ist, um die Virusreplikation zu kontrollieren. Als häufigste intrauterin übertragene Virusinfektion in den Industrieländern mit einer Inzidenz von 0,3 bis 2,5 % aller Lebendgeburten ist

die allgemeine Bedeutung dieser Infektion vergleichbar mit der Rötelnembryopathie vor Einführung der Rötelnimpfung.

HCMV ist weit verbreitet, wobei der Mensch das einzige Reservoir für das streng speziesspezifische Virus darstellt. HCMV-Infektionen sind in der Bevölkerung weltweit endemisch und unterliegen keiner saisonalen Schwankung (Krech et al. 1971, Gold & Nankervis 1976, Pass 2005). Die Durchseuchung liegt zwischen 20 und 100 % und ist stark abhängig von der untersuchten Population bzw. den sozioökonomischen Bedingungen (Krech 1973, Kumar & Nankervis 1979, Britt & Alford 1996). Im Allgemeinen ist die Prävalenz von HCMV-Infektionen in den Entwicklungsländern und in niedrigeren sozioökonomischen Schichten der Industrienationen deutlich höher (Britt & Alford 1996). So beträgt die Durchseuchungsrate in diesen Populationen ca. 90 %, in Industrieländern wie Nordamerika, Australien und Europa hingegen 30 bis 55 %. In Deutschland liegt die Durchseuchung ebenfalls bei ca. 45 bis 55 % (Enders 1985). Der Anteil seropositiver Frauen im gebärfähigen Alter variiert dementsprechend je nach Population.

Die Übertragung erfolgt von Mensch zu Mensch durch engen Kontakt mit infizierten Körperflüssigkeiten. HCMV wird von Virusausscheidern in Körpersekrete wie Urin, Speichel, zervikale und vaginale Sekrete, Samenflüssigkeit, Muttermilch und Tränenflüssigkeit sezerniert (Lang 1975, Alford 1993). Außerdem können Blutprodukte und Transplantatorgane zur Übertragung führen (Lang et al. 1975, Bowden 1991). HCMV-seropositive Mütter können HCMV in der Muttermilch ausscheiden und durch das Stillen ihre Kinder früh postnatal infizieren (Dworsky et al. 1983, Hamprecht et al. 1998, Hamprecht et al. 2001). Durchseuchungsgipfel treten im Kleinkindesalter (Schmierinfektion) und im jungen Erwachsenenalter mit beginnender sexueller Aktivität auf. Dabei stellen Kinderbetreuungsstätten und Krabbelgruppen eine mögliche Infektionsquelle für Kleinkinder dar. In den USA durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass ca. 50 % aller Kinder in Kindertagesstätten HCMV im Urin und Speichel ausscheiden, was bei der Verbreitung des Virus eine wichtige Rolle spielt (Pass et al. 1982, Adler 1988). Seropositive Kinder zwischen 6 Monaten und 2 Jahren können somit generell als kontagiös

angesehen werden. Die Infektion des Kindes führt in der Regel nicht zur Erkrankung, sie stellt vielmehr eine frühe, natürliche Immunisierung dar. Die frühe kindliche Durchseuchung birgt jedoch das Risiko der Primärinfektion seronegativer Eltern (ca. 45 %), deren Kleinkinder in einem Kinderhort betreut werden und Virusausscheider sind (Pass et al. 1986, Adler 1988). Damit ist auch ein hohes Risiko für Schwangere, eine Primärinfektion zu aquirieren, und damit die Gefahr einer intrauterinen Übertragung auf das ungeborene Kind verbunden (Pass et al. 1987). Während das Normalrisiko einer Primärinfektion in der Schwangerschaft bei 1 bis 4 % liegt (Ahlfors et al. 1982, Griffiths & Baboonian 1984, Stagno et al. 1986), tragen Erzieherinnen und Kindergärtnerinnen aufgrund ihrer beruflichen Exposition ein erhöhtes Konversionsrisiko (Pass et al. 1986, Adler et al. 1989, Pass et al. 1990, Murph et al. 1991). HCMV-Infektionen im Alter von 15 bis 20 Jahren sind vor allem im Hinblick auf schwangere Teenager aus niedrigen sozialen Verhältnissen relevant. So konnte innerhalb eines umfangreichen Studienkollektivs von Mutter-Kind-Paaren ein erhöhtes intrauterines Transmissionsrisiko vor allem für sehr junge und alleinerziehende Frauen gezeigt werden, die sich noch in Ausbildung befanden oder in Niedriglohnverhältnissen angestellt waren (Murph et al. 1998).

### **1.3 Immunantwort und virale Pathogenitätsfaktoren**

Von grundlegender Bedeutung für die Pathogenese der HCMV-Infektion ist die Balance zwischen Immunkontrolle durch das unspezifische sowie das erworbene Immunsystem einerseits und Virus-spezifischen Strategien, um der Immunabwehr zu entgehen, andererseits. Die unspezifische antivirale Immunität wird im wesentlichen durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und durch die Freisetzung humoraler antiviraler Faktoren wie Interferone, Tumornekrose-Faktor (TNF), Zytokine und Chemokine gebildet (Janeway et al. 2001). Um die Wirkung verschiedener dieser Faktoren zu blockieren, scheint HCMV über TNF-Rezeptorhomologe (Benedict et al. 1999) und Chemokin-Rezeptorhomologe zu verfügen (Billstrom et al. 1998). NK-Zellen lysieren

hauptsächlich virusinfizierte Zellen, die kein MHC-Klasse-I auf ihrer Oberfläche exprimieren. Möglicherweise schützt sich HCMV durch Expression eines MHC-Klasse-I-Homologs vor der zytotoxischen Wirkung der NK-Zellen (Beck & Barrell 1988). Den vorgenannten Mechanismen kommt vermutlich eine wichtige Bedeutung bei der viralen Primärreplikation im Organismus zu.

Im Rahmen der spezifischen bzw. erworbenen Immunität gegen HCMV sind seitens der zellulären Immunantwort insbesondere CD8+-zytotoxische T-Zellen (Walter et al. 1995, Adler et al. 1998, Jin et al. 2000) und seitens der humoralen Immunantwort neutralisierende Antikörper (Schoppel et al. 1998, Klein et al. 1999) effizient für die Immunkontrolle des Virus. Peptide, die von endogenen, intrazellulären Proteinen wie z. B. Virusproteinen stammen, werden vorwiegend von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert (Dazzi & Goldmann 1998). Diese induzieren eine CD8+-T-Lymphozytenantwort, sodass die Relevanz von CD8+-T-Zellen für die Abwehr einer HCMV-Infektion nahe liegt (Riddell & Greenberg 1997). Darüber hinaus wurde eine Korrelation zwischen der Aktivität zytotoxischer T-Zellen und dem Verlauf einer HCMV-Primärinfektion bei Transplantationspatienten gezeigt (Quinnan et al. 1982, Li et al. 1994, Krause et al. 1997). Im murinen Tiermodell schützen die spezifischen CD8+-T-Zellen vor der Virus-bedingten Gewebszerstörung und dadurch vor einem letalen Krankheitsverlauf (Reddehase et al. 1987), wohingegen das Fehlen dieser Lymphozyten mit einer disseminierten Infektion und fatalem Verlauf verbunden ist (Podlech et al. 2000). Dem stehen Strategien des HCMV entgegen, um der zellulären Immunantwort zu entgehen. Beispielsweise wird nach Expression der frühen viralen Gene in infizierten Zellen die Bildung von MHC-Klasse-I-Molekülen unterdrückt und somit ihre Zerstörung durch zytotoxische T-Zellen verhindert (Beersma et al. 1993, Steimassl & Hamprecht 1994, Riddell & Greenberg 1995, Wiertz et al. 1996, Ploegh 1998, Hengel et al. 1999, Benz et al. 2001). Diese Strategie wird auch für eine Reihe anderer Viren beschrieben, die zur Persistenz fähig sind (z. B. HSV, EBV, HIV).

Die humorale Immunantwort spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die Immunkontrolle der HCMV-Infektion. Beim murinen CMV scheint die humorale Immunantwort limitierend auf die Virus-Dissemination zu wirken und so vor

allem den klinischen Verlauf der Erkrankung zu beeinflussen (Koszinowski et al. 1990). Der Schutz seropositiver Individuen vor einer Reinfektion konnte mit dem Titer neutralisierender Antikörper korreliert werden (Adler et al. 1995). Auch für die intrauterine Transmission konnte die Signifikanz der humoralen Immunantwort gezeigt werden. So senkt eine präkonzeptionelle Immunität das Risiko der Transmission und einer schweren kindlichen Schädigung entscheidend (Fowler et al. 1992; Adler et al. 1995, Stagno 1995, Revello et al. 2002, Fowler et al. 2003).

Während der Infektion werden Antikörper gegen eine Vielzahl von viralen Proteinen gebildet (Landini & Michelson 1988, Britt 1991). Es können Antikörper gegen Strukturproteine wie das Hauptkapsidprotein (MCP/UL86) sowie die Tegumentproteine pp65 (UL83), pp71 (UL82), pp28 (UL99) und pp150 (UL32) nachgewiesen werden (Jahn et al. 1987, Plachter et al. 1990, Schoppel et al. 1997, Greijer et al. 1999). Die Glykoproteine gB und gH stellen ebenfalls wichtige Antigene für die Induktion einer Antikörperantwort dar (Rasmussen et al. 1984, Meyer et al. 1988, Britt et al. 1990, Britt & Mach 1996). Aber auch nicht-strukturelle Proteine können eine ausgeprägte Antikörperantwort hervorrufen (Alford 1993, Vornhagen et al. 1995). Ein wichtiger spezifischer antiviraler Abwehrmechanismus ist die Virus-Neutralisation durch Antikörper. Sie kann als Prozess angesehen werden, bei dem Virionen von Antikörpern gebunden werden, wodurch die Interaktion mit den Oberflächen-Rezeptoren oder die Fusion der Virus-Membran mit der Wirtszelloberfläche gestört wird (Janeway et al. 2001, Burton et al. 2000). Neutralisierende Antikörper sind hauptsächlich gegen die Glykoproteine der Virushülle gerichtet, welche einen guten Angriffspunkt darstellen. Bei HCMV sind gB und gH sowie gM in der Lage, neutralisierende Antikörper zu induzieren (Britt 1991, Marshall et al. 1992, Urban et al. 1992, Wagner et al. 1992, Kropff et al. 1993; Li et al. 1995). Auch in Bezug auf die Virusneutralisation verfügt HCMV über Mechanismen, diese zu unterlaufen (Mocarski & Courcelle 2001). Zum einen wird HCMV durch die weitgehend zellassozierte Ausbreitung, bei der das Virus von Zelle zu Zelle weiterverbreitet wird, dem Zugang neutralisierender Antikörper entzogen. Zum anderen kann HCMV die Expression eines Glykoproteins induzieren, welches

sich wie ein Fc-Rezeptor verhält, der unspezifisch an Antikörper bindet (Griffiths & Grundy 1987). Die damit zusammenhängende Maskierung der Fc-Anteile gebundener Antikörper könnte die Komplementaktivierung verhindern und das Virus auf diese Weise vor der Zell-Lyse bewahren (MacCormac & Grundy 1996).

Die Vielfalt der Immunevasionsstrategien sichern HCMV das Überleben im immunkompetenten Wirt, dessen Immunantwort aber dennoch ausreichend scheint, um Krankheitserscheinungen zu verhindern (Hengel et al. 1998). Wird jedoch diese Balance aufgrund einer unzureichenden Immunkompetenz zugunsten des Virus verschoben, ist eine klinische Manifestation wahrscheinlich.

Um die schweren bis tödlichen Krankheitsbilder bei Neugeborenen oder Immunsupprimierten zu verursachen, muß HCMV die Fähigkeit haben, sich sehr effizient im Wirtsorganismus auszubreiten, und ein breites Spektrum an Zielzellen aufweisen. HCMV ist in der Lage hämatogen zu disseminieren, wobei infektiöses Virus hauptsächlich zellgebunden in Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, aber auch in Endothelzellen verbreitet wird (Gerna et al. 1992, Grefte et al. 1993, Grefte et al. 1994, Sinzger et al. 1995, Sinzger & Jahn 1996). Makrophagen scheinen darüber hinaus in der Lage zu sein, das Virus durch Kontakt auf Endothelzellen oder Gewebe verschiedener Organe zu verbreiten (Waldman et al. 1995). Insbesondere auch die unreifen dendritischen Zellen stellen ein hervorragend geeignetes Vehikel zur Dissemination des HCMV dar (Jahn et al. 1999). HCMV-DNA kann sowohl in Leukozyten als auch im Plasma nachgewiesen werden; somit ist es möglich, dass es auch in zellfreier Form im Blut zirkuliert (Wolf et al. 1993). Das große Spektrum an ubiquitär vorkommenden Zielzellen wie Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten erlauben die Replikation in nahezu jedem Organ (Roberts et al. 1989, Sinzger et al. 1993a, Sinzger et al. 1995, Plachter et al. 1996). Der Befall spezialisierter Parenchymzellen wie Neurone des Gehirns und der Retina sowie glatte Muskelzellen des Gastrointestinaltraktes und Hepatozyten wird im klinischen Bild reflektiert (Sinzger et al. 1993b, Rummelt et al. 1994, Sinzger et al. 1995, Plachter et al. 1996, Sinzger et al. 1999). Die Zell- und Organschädigung kann



dabei sowohl durch direkte als auch indirekte Zytotoxizität verursacht werden. Beispielsweise leiden Kinder mit schwerer kongenitaler HCMV-Infektion oft an einer Vaskulitis, die häufig mit einer disseminierten intravasalen Koagulopathie assoziiert ist. Die resultierende Perfusionsstörung ist somit sowohl als Folge der viralen Infektion von Endothelzellen als auch der sekundären Reaktion des menschlichen Organismus zu sehen.

## **1.4 Die kongenitale HCMV-Infektion**

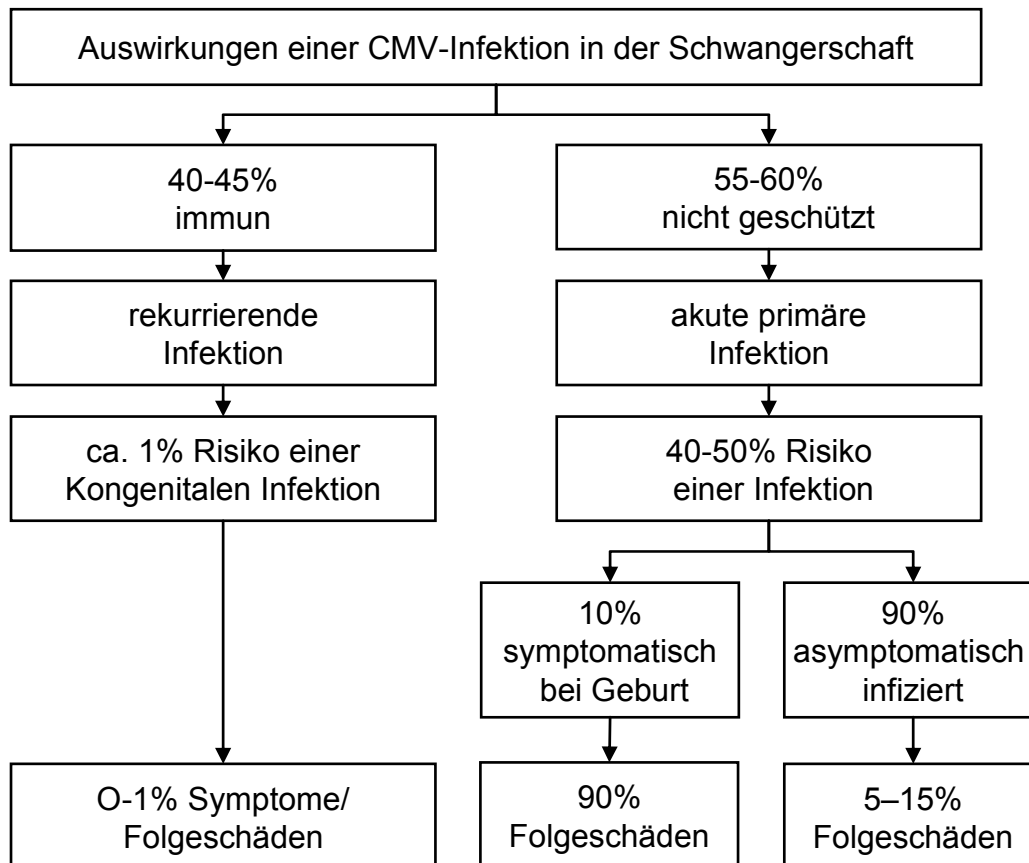
### **1.4.1 Ursachen und Häufigkeit der kongenitalen HCMV-Infektion**

Die kongenitale HCMV-Infektion ist die weltweit häufigste angeborene Virusinfektion. Im Gegensatz zu Infektionen wie Röteln oder Toxoplasmose können sowohl primäre als auch rezidivierende HCMV-Infektionen eine intrauterine Transmission zur Folge haben (Numazaki et al. 1970, Stagno et al. 1977, Boppana et al. 1999), wobei eine rezidivierende HCMV-Infektion sowohl Folge einer Reaktivierung als auch einer Reinfektion mit einem differenten Virusstamm sein kann. Das Risiko einer maternofetalen intrauterinen Übertragung sowie einer symptomatischen kongenitalen HCMV-Infektion hängt jedoch wesentlich von der Art der mütterlichen Infektion ab. Nach rezidivierender maternaler Infektion ist etwa 1 % der Neugeborenen kongenital infiziert, aber nur wenige darunter zeigen eine symptomatische Infektion (Fowler et al. 1992). Im Allgemeinen ist bei einer rezidivierenden Infektion mit einer mildereren Symptomatik zu rechnen als bei infizierten Kindern primär seronegativer Mütter (Ahlfors et al. 1981, Stagno et al. 1982, Rutter et al. 1985, Fowler et al. 1992), jedoch kommen auch schwerwiegende Schädigungen der Neugeborenen vor (Ahlfors et al. 1999, Boppana et al. 1999, Rousseau et al. 2000, Boppana et al. 2001). Wie häufig symptomatische kongenitale Infektionen Folge einer rezidivierenden Infektion sind, ist noch nicht sicher geklärt.

Die mütterliche Primärinfektion während der Schwangerschaft stellt den Hauptrisikofaktor für eine kongenitale HCMV-Infektion und schwere Embryofetopathien dar. Die Transmissionsrate beträgt 40 – 50 % (Stagno et al. 1986, Nigro et al. 2005); bisher ist allerdings nicht geklärt, welche Faktoren in

diesen Fällen zur Übertragung führen, den übrigen Anteil aber vor einer Übertragung schützen. Eine Primärinfektion kann in allen Trimenen zur Transmission führen, wobei die fetale Infektionsrate im Laufe der Schwangerschaft steigt (Daiminger et al. 2005). Das Risiko für schwere kindliche Schäden ist aber in den ersten 20 Schwangerschaftswochen (SSW) höher als in der Spätschwangerschaft. Durch eine Primärinfektion hervorgerufene kongenitale HCMV-Infektionen führen bei ca. 10 % der Neugeborenen zu Krankheitssymptomen, während 90 % der infizierten Kinder bei Geburt asymptomatisch infiziert sind. Von den bei Geburt unauffälligen Kindern entwickeln 10 bis 15 % Folgeschäden in Form von mentaler Retardierung oder Schwerhörigkeit. Es wurden auch Fälle beschrieben, bei denen eine HCMV-Infektion in der Frühschwangerschaft zum Abort geführt hat (Kriel et al. 1970, Dehner & Askin, 1975). Untersuchungen zum Transmissionsrisiko bei prä- oder perikonzeptionell erworbener HCMV-Primärinfektion haben eine erhöhte Übertragungsrate von ca. 9 % bei präkonzeptioneller Infektion (Revello et al. 2006) und 31 – 45 % bei perikonzeptioneller Infektion gezeigt (Revello et al. 2002, Daiminger et al. 2005). Perikonzeptionell primärinfizierte Frauen sind also der Risikogruppe zuzuordnen, deren Infektionszeitpunkt in der Schwangerschaft liegt.

Eine Zusammenfassung des Transmissions- und Schädigungsrisikos bei primärer und rekurrerender maternaler HCMV-Infektion ist im folgenden Schema dargestellt.



**Abbildung 1:** Fließschema zum Transmissionsrisiko bei primärer und rekurrerender HCMV-Infektion in der Schwangerschaft bezogen auf die Seroprävalenz in Deutschland

Die Häufigkeit der kongenitalen HCMV-Infektion wird im Allgemeinen mit einer durchschnittlichen Rate von 1% angegeben. In Abhängigkeit vom Durchseuchungsgrad variiert die Rate von 0,2 bis 2,5 % (Stagno et al. 1982, Ahlfors 1999, Casteels et al. 1999, Halwachs-Baumann et al. 2000). Aus einer Metaanalyse verschiedener Studien zur Häufigkeit der kongenitalen HCMV-Infektion in Europa ergab sich eine gepoolte Prävalenzschätzung von 0,35 % (Halwachs-Baumann 2003). Von einer Geburtenrate in Deutschland von ca. 700.000 Geburten pro Jahr ausgehend bedeutet das, dass pro Jahr ca. 2450 Kinder kongenital infiziert sind, von denen ca. 245 Kinder symptomatische Infektionen aufweisen. Bei einer Mortalitätsrate von 5 % (Ross & Boppana 2004) der symptomatisch infizierten Kinder würden etwa 12 Todesfälle verzeichnet. Von den bei Geburt unauffälligen Kindern (ca. 2200) entwickeln 10 bis 15 % (ca. 220) bis zum 7. Lebensjahr Folgeschäden in Form von mentaler

Retardierung oder Schwerhörigkeit. Damit sind in Deutschland jährlich fast 500 Kinder von Folgeschäden der HCMV-Infektion betroffen.

#### **1.4.2 Klinik der kongenitalen HCMV-Infektion**

Die klinisch apparente kongenitale HCMV-Infektion ist durch die Beteiligung multipler Organe charakterisiert, wobei insbesondere das retikuloendotheliale System und das ZNS mit oder ohne okulärer oder auditorischer Schädigung betroffen sind. Zu den häufigsten Abnormitäten bei symptomatischer kongenitaler Infektion zählen Petechien, Ikterus, Hepatosplenomegalie, Mikrozephalie, intrakranielle Verkalkungen und Wachstumsretardierung sowie Laborbefunde wie Thrombozytopenie und Erhöhung der GPT (Weller et al. 1962, Boppana et al. 1992, Ross & Boppana 2004). Weitere Symptome sind Leistenhernien bei männlichen Neugeborenen, Retinitis, eventuell mit Optikusatrophy, Hydrocephalus, hämolytische Anämie und Pneumonie. Das Vollbild einer symptomatischen kongenitalen HCMV-Infektion mit ausgedehnter Organbeteiligung und schwerer kindlicher Schädigung tritt in ca. 10 – 15 % der Fälle auf. Das typische Bild der zytomegalen Einschlusskörperkrankheit -Cytomegalic Inclusion Disease (CID)- ist histopathologisch durch Riesenzellbildung, sogenannte Eulenaugenzellen, charakterisiert und liegt bei ungefähr 5 % der kongenital infizierten Neugeborenen vor.

Die Mortalitätsrate liegt bei ca. 5 %, wobei die meisten Todesfälle in der Neonatalzeit vorkommen und durch Multiorganversagen mit schwerer hepatischer Dysfunktion, disseminierter intravasaler Gerinnung und bakterieller Superinfektion bedingt sind. Todesfälle nach dem ersten Lebensjahr kommen bei neurologisch schwer geschädigten Kindern vor und entstehen meist durch Malnutrition, Aspirationspneumonien oder Superinfektionen. Die Wahrscheinlichkeit, nach symptomatischer kongenitaler HCMV-Infektion mit normalem Gehör und Intellekt zu überleben, ist gering (Pass et al. 1980, Ramsey et al. 1991, Boppana et al. 1992). Die überlebenden Kinder entwickeln leichte bis schwere psychomotorische und kognitive Handicaps (Ross & Boppana 2004). Prospektive Studien haben gezeigt, dass etwa die Hälfte der

symptomatisch infizierten Kinder Hörstörungen, mentale Retardierung mit einem IQ < 70 sowie Mikrozephalie entwickelt (Williamson et al. 1982, Conboy et al. 1987, Boppana et al. 1992). Obwohl die Langzeitprognose der 90 % asymptomatisch kongenital infizierten Kinder wesentlich besser ist, entwickeln mindestens 10 % im Kleinkindalter eine sensorineuronale Hörstörung. Außerdem kommt es bei etwa 5 % der anfangs inapparent infizierten Neugeborenen zu einer Mikrozephalie und neuromuskulären Defekten, bei 2 % dieser Kinder wird eine Retinitis beobachtet.

### **1.4.3 Therapie und Prophylaxe**

Zurzeit existiert für HCMV noch kein sicherer Impfstoff. Verschiedene attenuierte Lebendvakzine wurden hinsichtlich Verträglichkeit und Immunogenität untersucht (Towne-Stamm, AD169-Stamm), keine konnte jedoch eine HCMV-Infektion sicher verhindern (Plotkin et al. 1989, Adler 1995). Eine Lebendvakzine birgt auch das unkalkulierbare Risiko der Rekurrenz und Latenz sowie einer möglichen onkogenen Potenz von HCMV. Die Entwicklung einer risikofreien und dennoch wirksamen Subunit-Vakzine ist Gegenstand aktueller Forschung.

Zur antiviralen Chemotherapie von HCMV-Infektionen sind derzeit Ganciclovir, Foscarnet und Cidovovir zugelassen. Seit geraumer Zeit ist zudem Valganciclovir verfügbar. Während die antivirale Chemotherapie von Patienten nach Transplantation solider Organe oder Stammzelltransplantation Standard ist, gibt es derzeit keine Therapieempfehlung zur Chemoprophylaxe in der Schwangerschaft oder zur Therapie kongenital infizierter Kinder. Die noch fehlenden Therapiestudien dürften im Toxizitätsprofil der Wirkstoffe und dem fehlenden Konsens über die Definition einer potentiellen Ganciclovir/Valganciclovir-Behandlungsindikation begründet sein. Ganciclovir hat in erster Linie myelosuppressive Wirkung. Obwohl es liquorgängig ist, muss man berücksichtigen, dass eine postnatale Therapie intrauterin erworbene neurologische Defekte nicht beeinflussen kann. Für Valganciclovir gibt es kaum Erfahrungen in Bezug auf die Therapie der kongenitalen HCMV-Infektion.

Foscarnet ist nephrotoxisch und hat Einfluss auf die Knochen- und Zahnentwicklung. Cidovovir ist ebenfalls nephrotoxisch und kann Neutropenie, Augenhypotonie und eine metabolische Azidose induzieren und sollte vor dem Hintergrund einer Langzeitkarzinogenität und reproduktiven Toxizität bei Kindern mit Zurückhaltung eingesetzt werden (Kimberlin 2005). Unter Berücksichtigung des Risikoprofils bleibt aktuell nur Ganciclovir zur Behandlung der kongenitalen HCMV-Infektion. Eine kontrollierte Studie konnte bei Ganciclovir-behandelten kongenital infizierten Kindern mit ZNS-Symptomatik ein verbessertes oder stabiles Hörvermögen demonstrieren (Kimberlin et al. 2003). In weiteren, allerdings unkontrollierten Studien und Fallberichten wurden positive Therapieeffekte durch die Behandlung erzielt (Nigro et al. 1994, Whitley et al. 1997, Michaels et al. 2003, Rojo et al. 2004, Jansen et al. 2005). Dabei bewirkt die Ganciclovirtherapie bei Akutsymptomatik wie z. B. schwerer Pneumonie, Hepatitis oder Thrombozytopenie eine Besserung der Symptome. Bei Geburt bestehende Schäden wie Mikrozephalie oder intrazerebrale Verkalkungen können dagegen durch eine Therapie kaum rückgängig gemacht werden. Als Fazit aus den bisherigen Therapiedaten wurde eine Verlängerung der Therapiedauer auf ein Jahr vorgeschlagen (Whitley 2004).

Der Einsatz von HCMV-Hyperimmunglobulin bei primärinfizierten Schwangeren könnte eine Strategie zur Prävention kongenitaler HCMV-Infektion darstellen, wie eine Studie gezeigt hat (Nigro et al. 2005).

### **1.5 Diagnose und Risikoabschätzung der kongenitalen HCMV-Infektion**

Die Diagnose einer kongenitalen HCMV-Infektion kann unabhängig vom Vorliegen einer Symptomatik mittels einer Kurzzeitvirkultur aus Urin über Nacht erfolgen. Die Virusanzüchtung aus Urin oder Rachenspülwasser ist weiterhin der diagnostische Goldstandard zur Feststellung einer kongenitalen HCMV-Infektion. Zum raschen Virusnachweis eignet sich außerdem der Nachweis von HCMV-DNA durch PCR. Insbesondere die „real-time“-PCR mittels LightCycler ermöglicht eine Diagnosestellung innerhalb von 1 – 2 h inklusive Probenaufarbeitung (Schalasta et al. 2000). Gegenüber der

Kurzzeitviruskultur-Methode hat die PCR den Vorteil, dass sie auch inaktiviertes Virus nachweist. Dies ist wichtig im Hinblick auf Urine, bei denen das gegenüber Umwelteinflüssen labile Virus durch einen zu langen Sammelprozess oder unsachgemäße Lagerung zerstört worden ist. Um die Diagnose einer kongenitalen Infektion zu sichern, muss der Nachweis innerhalb der ersten beiden Lebenswochen erfolgen, weil die Differenzierung zwischen prä- bzw. früh postnatal erworbener Infektion nur in diesem Zeitraum möglich ist. Sofern Blutproben mittels PCR untersucht werden, sollte das Zeitfenster eher auf 10 Tage begrenzt werden, da gezeigt werden konnte, dass postnatal durch Stillen übertragenes Virus bereits ab dem 12. Lebenstag im Blut nachweisbar sein kann (Hamprrecht et al. 2001). Eine retrospektive postpartale HCMV-Diagnostik kann durch Trockenblutfilterkarten (Guthrie-Karten) mittels DNA-Amplifikation aus Trockenblut durchgeführt werden, was vor dem Hintergrund der Entwicklung von Hörschäden als Langzeitfolge eine wichtige diagnostische und epidemiologische Bedeutung hat. Da sich HCMV-assoziierte Hörstörungen aggravieren können, wäre die frühzeitige Anpassung eines Hörgerätes oder die Einleitung einer antiviralen Therapie eine direkte therapeutische Konsequenz.

Die Diagnose der mütterlichen Primärinfektion ist zur Erfassung von Risikoschwangerschaften entscheidend. Die klassische serologische Diagnose erfolgt durch den Nachweis einer Serokonversion oder einen Abfall des IgM-Titers im Verlauf. Eine Serokonversion kann jedoch selten festgestellt werden, da nur bei wenigen Frauen der Serostatus vor der Schwangerschaft bekannt ist. Eine frühere HCMV-Infektion ist im Allgemeinen durch einen positiven IgG-Titer bei fehlenden IgM-Antikörpern charakterisiert. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass ein positiver IgM-Befund häufig durch langpersistierende IgM-Antikörper (> 1 Jahr) oder durch eine rekurrende HCMV-Infektion in der Schwangerschaft verursacht wird und somit kein Beweis für eine Primärinfektion ist. Um zwischen primärer und rekurrender Infektion zu differenzieren, wurden verschiedene diagnostische Kriterien entwickelt. Die Bestimmung von neutralisierenden Antikörpern im Mikroneutralisationstest bzw. im rekombinanten Westernblot ist ein wichtiger diagnostischer Marker (Eggers

et al. 2000a, Eggers et al. 2000b). Da die humorale Immunantwort bei primärer HCMV-Infektion durch eine etwa ein bis drei Monate verzögerte Kinetik der neutralisierenden Antikörperbildung gekennzeichnet ist (Schoppel et al. 1997, Eggers et al. 1998, Klein et al. 1999), kann eine Primärinfektion bei hohen Titern neutralisierender Antikörper bzw. in Anwesenheit einer glykoprotein-spezifischen Antikörperantwort ausgeschlossen werden. Ein weiteres Kriterium bietet die Aviditätsbestimmung (Lazarotto et al. 1997, Bodeus et al. 1998, Lazarotto et al. 1999). Diese Methode beruht auf der funktionellen Affinität der IgG-Antikörper für das entsprechende Antigen. Während im frühen Stadium der Infektion Antikörper mit niedriger Affinität gebildet werden, sind hochaffine Antikörper Marker für eine länger bestehende Immunität. Mit diesen Testmethoden kann sehr gut zwischen Risikoschwangerschaften und falsch-positiven HCMV-IgM-Befunden unterschieden werden. Liegt tatsächlich eine Primärinfektion vor, kann somit gezielt zur pränatalen Diagnostik geraten werden. Allerdings kommt es nur bei 40 – 50 % der primärinfizierten Mütter zu einer intrauterinen Übertragung. Eindeutige prädiktive Marker zur Identifikation der Überträgerinnen existieren bislang nicht.

Im Rahmen der pränatalen Diagnostik sind Fruchtwasser oder Fetalblut zum Erregernachweis geeignet (Grose et al. 1990, Lamy et al. 1992, Lynch et al. 1991, Weber et al. 1992, Lazarotto et al. 1998). Dabei wird Fruchtwasser als Untersuchungsmaterial der Wahl angesehen (Lazarotto et al. 1998, Revello et al. 1998, Lazarotto et al. 2000). Geeignete Nachweismethoden sind PCR und die Virusisolierung, wobei mit einer Kombination beider Methoden eine sehr gute Sensitivität und Spezifität erreicht wird. Vom Zeitpunkt der maternalen Infektion dauert es in den meisten Fällen zumindest 6 bis 9 Wochen, bis das Virus im Fruchtwasser nachgewiesen werden kann (Donner et al. 1994), was bei der Planung der pränatalen Diagnostik miteinbezogen werden muss, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden (Revello & Gerna 2004). Eine Amniozentese vor der 21. SSW birgt angesichts der nach der 20. SSW einsetzenden fetalen Diurese ebenfalls die Gefahr falsch-negativer Ergebnisse. Als Goldstandard für die Pränataldiagnose hat sich aufgrund der hohen Spezifität die Virusisolierung erwiesen. Die Bestimmung der fetalen IgM-



Antikörper im Nabelschnurblut ist eine weitere diagnostische Möglichkeit, weist aber eine beschränkte Sensitivität auf.

Eine prognostische Aussage zur Symptomatik einer kongenitalen HCMV-Infektion kann bei Auffälligkeiten in der Ultraschalldiagnostik gemacht werden. Zu den sonographischen Befunden bei intrauteriner HCMV-Infektion gehören fetale Wachstumsretardierung, Erweiterung der Liquorräume, Aszites, intrakranielle Verkalkungen, Oligohydramnion, Mikrozephalie, Hepatosplenomegalie und Kardiomegalie (Crino 1999). Zum Zeitpunkt der Feststellung der klinischen Zeichen im Ultraschall ist jedoch in zahlreichen Fällen eine Unterbrechung der Schwangerschaft nicht mehr möglich. Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass die Viruslastbestimmung im Fruchtwasser mittels quantitativer PCR von prognostischem Wert bezüglich der kindlichen Schädigung sein könnte (Lazarotto et al. 2000, Revello & Gerna 2004).

## **1.6 Diaplazentare Infektionsübertragung**

### **1.6.1 Bau und Funktion der menschlichen Plazenta**

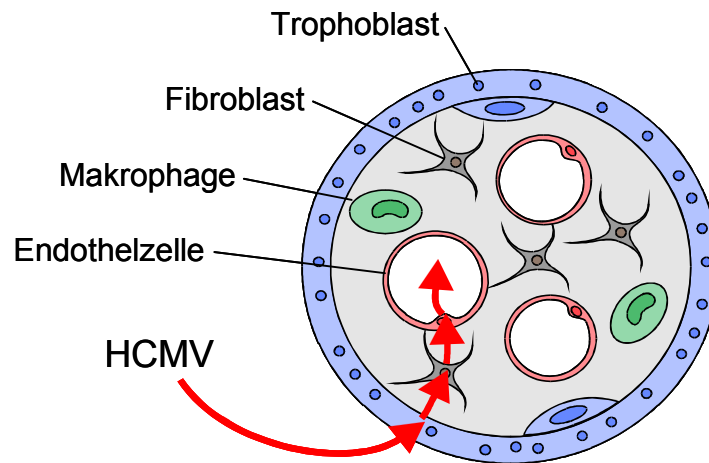
Die reife Plazenta ist ein scheibenförmiges Organ und hat einen Durchmesser von ca. 20 cm. Nach der Geburt ist sie ca. 3 cm dick und 500 g schwer. Sowohl die Versorgung des kindlichen Organismus mit allen nötigen Nähr- und Baustoffen sowie mit Sauerstoff als auch die Abgabe von Stoffwechselprodukten und CO<sub>2</sub> erfolgt über die Plazenta. Das zum Großteil aus fetalem Gewebe bestehende Organ dient dem immunologischen Schutz der fetoplazentaren Einheit und ist zur Bildung von Hormonen fähig (Schiebler & Schneider 1991). Die Chorionplatte bildet die fetale Begrenzung des intervillösen Raums, dient der Verankerung der Nabelschnur und ist Leitstruktur für Gefäße. Im Bindegewebe der Chorionplatte verlaufen zahlreiche Äste der Nabelschnurgefäße, die sich mit den Zottenbäumen verzweigen und bis zur Geburt eine Länge von bis zu 320 km erreichen können (Blaschitz et al. 2001). Die Zottenbäume werden im intervillösen Raum von mütterlichem Blut umspült und sind außen von einer einzelligen Schicht villöser Trophoblasten überzogen,

die zur Oberfläche hin, unter Verlust ihrer Zellgrenzen, ein Synzytium bilden. Unter dem Synzytiotrophoblast liegt der Zytotrophoblast, dessen Zellen als Proliferationsort angesehen werden. Dadurch wird der Fortbestand des Synzytiotrophoblasten bis zum Geburtstermin gesichert. Das Zottenbindegewebe ist vom Zytotrophoblasten durch eine Basalmembran getrennt und enthält ortsständige Bindegewebszellen wie Mesenchymzellen, Fibroblasten und Retikulumzellen sowie Interzellulärschicht, retikuläre Fasern und Kollagenfasern. Die Maschen des Bindegewebes enthalten neben fetalen Blutgefäßen zahlreiche Hofbauer-Zellen (Gewebsmakrophagen). Die sogenannten Haftzotten sind mit der Gebärmutter Schleimhaut (Dezidua) verwachsen. Dafür verantwortlich ist eine eigene Trophoblastenpopulation, die extravillösen Zytotrophoblasten (Loke & King 1995). Diese invadieren die Dezidua und teilweise auch das Myometrium, wobei sie auch am Umbau der Spiralarterien mitwirken. Die Zytotrophoblasten dringen in die mütterlichen uteroplazentaren Gefäße ein, bilden dort Zellplaques und ersetzen teilweise das auskleidende Endothel (Pröll et al. 1996). Die Grenzschichten zwischen maternalem und fetalem Kreislauf, bestehend aus Synzytio- und Zytotrophoblast mit Basalmembran, Zottenbindegewebe, Basalmembran und Endothel der Kapillaren werden als Plazentaschranke bezeichnet. Sie haben entscheidenden Einfluß auf den transplazentaren Austausch. Der transepitheliale Transport läuft teils aktiv, teils passiv ab. In maternofetaler Richtung ist auch der Transport von Makromolekülen möglich, wobei insbesondere ein aktiver Transportmechanismus für Immunglobuline besteht (Schiebler und Schneider 1991).

### **1.6.2 Plazentare Infektion und intrauterine Transmission von HCMV**

Die intrauterine Übertragung von HCMV auf den Feten erfolgt primär hämatogen diaplazentar. Eine intrauterine Infektion der Plazenta scheint grundsätzlich einer Infektion des Feten voranzugehen (Hayes & Gibas 1971, Benirschke et al. 1974, Mostoufi-Zadeh et al. 1984), jedoch folgt nicht jeder plazentaren Infektion eine fetale Infektion. Bei der hämatogen diaplazentaren

Übertragung gelangt das infektiöse Virus während der virämischen Phase der Mutter zunächst in den intervillösen Raum. Um letztendlich den fetalen Blutkreislauf zu erreichen, muß es die Plazentaschranke passieren.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der transplazentaren Transmission von HCMV

Aufgrund der Lokalisation an der maternofetalen Grenzschicht kommt den Trophoblasten bei der Übertragung eine entscheidende Rolle zu. Die synzytiale Natur der ersten Zellschicht legt nahe, dass der Transfer sämtlicher Stoffe zwischen Mutter und Kind transzellulär erfolgt. HCMV ist in der Lage, die Trophoblastenschicht produktiv zu infizieren und zu passieren (Halwachs-Baumann et al. 1998, Hemmings et al. 1998, Fisher et al. 2000). In vitro-Experimente zeigten, dass eine Virusfreisetzung sowohl in Richtung des mütterlichen als auch in Richtung des kindlichen Kreislaufs möglich ist (Hemmings & Guilbert 2002). Bisher ist noch nicht geklärt, ob für die maternofetale Transmission zellfreies oder Leukozyten-assoziiertes Virus erforderlich ist. Zellfreies Virus könnte an viruspezifische Rezeptoren binden und die Trophoblasten direkt infizieren. Andererseits könnten Fc-Rezeptoren der Zelloberflächen einen Transfer von Virus-IgG-Komplexen durch den Trophoblasten ins Zottenstroma vermitteln. Neuere Analysen sprechen für eine signifikante Rolle des letztgenannten Weges für die plazentare Infektion (Pereira et al. 2003, Maidji et al. 2006, McDonagh et al. 2006). Zellgebundenes infektiöses Virus, beispielsweise in Form von infizierten Makrophagen oder

Endothelzellen, könnte den Trophoblasten durch Zell-zu-Zell-Übertragung infizieren. Dies ist durchaus vorstellbar, da mütterliche Makrophagen während der gesamten Schwangerschaft in enger Nachbarschaft mit Trophoblasten vorkommen (Hunt 1989). Ob für die intrauterine Transmission eine produktive Infektion der Stromazellen nötig ist, ist letztlich nicht geklärt. Jedoch wurde nachgewiesen, dass HCMV fähig ist, Stromazellen wie z. B. Fibroblasten, Hofbauer-Zellen sowie Endothelzellen zu infizieren und damit eine Villitis zu verursachen (Schwartz et al. 1992, Sinzger et al. 1993a, Fisher et al. 2000). Darüber hinaus konnte in Untersuchungen an intakten Gewebeteilen der Plazenta gezeigt werden, dass das Virus durch Übertragung von Zelle zu Zelle villöse Stromazellen und Kapillarendothelzellen erreichen kann (Gabielli et al. 2001). Von produktiv infizierten Endothelzellen könnte das Virus freigesetzt werden und direkt in die fetale Blutbahn gelangen oder über abgelöste Endothelzellen weiterverbreitet werden (Grefte et al. 1993).

Für die Pathogenese der plazentaren HCMV-Infektion und der intrauterinen Transmission sind die immunologischen und physikalischen Eigenschaften der Plazenta in Verbindung mit HCMV-spezifischen Eigenschaften von Bedeutung. Die Plazenta scheint nicht-immunologisch vermittelte Abwehrmechanismen zu besitzen. Beispielsweise sind Trophoblasten fähig, Interferone zu sezernieren, was dem Schutz vor viralen Infektionen dienen könnte (Aboagye-Mathieson et al. 1996). Auch die im Zottenstroma gelegenen Hofbauer-Zellen spielen eine wichtige protektive Rolle. Sie tragen Fc-Rezeptoren und sind fähig Immunkomplexe zu phagozytieren (Bright et al. 1994). Der Synzytiotrophoblast enthält außerdem große Mengen des Enzyms NO-Synthetase, welches die Plättchenaggregation und Anlagerung mütterlicher Leukozyten an die Zottenoberfläche verhindern kann (Burton & Watson 1997). Auch die rein physikalische Plazenta-Barriere kann zum Schutz vor Übertragung beitragen. Andererseits führen von der Plazenta produzierte Faktoren wie Progesteron (Piccinni et al. 1995), Prostaglandin E<sub>2</sub> (Kelly & Critchley 1997) und Cytokine wie Interleukin-4 und Interleukin-10 (Wegmann et al. 1993) zu einer Suppression der Th1-Immunantwort. Hierdurch wird die zellvermittelte Immunantwort inhibiert, deren maßgebliche Effektoren die zytotoxischen T-

Lymphozyten sind. Die daraus resultierende mütterliche Immunsuppression ist mit einem erhöhten Infektionsrisiko verbunden, wobei die Gefahr für den Feten noch durch dessen unreifes eigenes Immunsystem verstärkt wird. Im Gegensatz dazu scheint die Th2-Antwort durch verschiedene Mediatoren während der Schwangerschaft aktiviert zu werden (Sacks et al. 1999). Auch das unspezifische Immunsystem unterliegt einer Stimulation, was erhöhte Monozyten- und Granulozytenzahlen sowie veränderte Plasmaspiegel von Akutphase-Proteinen zeigen (Sacks et al. 1999). Jedoch ist gerade die spezifische Immunantwort von entscheidender Bedeutung im Hinblick auf Virusinfektionen bzw. intrazelluläre Erreger, die unspezifischen Immunmechanismen wie z. B. Phagozytose weniger zugänglich sind.

Zur Vermeidung einer Abstoßung exprimieren villöse Trophoblasten weder MHC-Klasse-I- noch MHC-Klasse-II-Moleküle. Dadurch wird verhindert, dass mütterliche Lymphozyten die Zellen angreifen. Allerdings kann das Fehlen von MHC-Klasse-I-Molekülen wiederum die HCMV-Infektion des Trophoblasten und damit die intrauterine Transmission erleichtern (Burton & Watson 1997). Die Expression des nicht-klassischen MHC-Klasse-Ib-Molekül HLA-G auf extravillösen Trophoblasten (Kovats et al. 1990, McMaster et al. 1995) führt zu einer Hemmung von NK-Zellen (Münz et al. 1997) und scheint nicht mit einer Stimulation zytotoxischer T-Zellen einherzugehen (Sargent 1993). Eine durch HCMV-induzierte verminderte Expression von HLA-G-Molekülen wurde beschrieben und könnte zu einer gegen die Trophoblasten gerichteten Immunantwort führen (Fisher et al. 2000). Des Weiteren wurden HCMV-vermittelte Mechanismen beschrieben, die zu einer Beeinträchtigung der Invasions- sowie der Differenzierungsfähigkeit von extravillösen Trophoblasten führen. So konnte in vitro gezeigt werden, dass die Infektion extravillöser Trophoblasten mit einer Down-Regulierung bestimmter Adhäsionsmoleküle einhergeht, was zur Beeinträchtigung der Invasionsfähigkeit führt (Fisher et al. 2000). Außerdem könnten Hinweise, dass eine HCMV-induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  zum Zelltod und damit zur Schädigung der Trophoblasten-Barriere führt (Chan et al. 2002), HCMV-assoziierte Phänomene wie Aborte in der Frühschwangerschaft, aber auch intrauterine Wachstumsretardierung und

Frühgeburtlichkeit erklären. Auch der Virusnachweis in mikrovaskulären Endothelzellen der Plazenta (Sinzger et al. 1993a) lässt pathologische Konsequenzen wie Wachstumsretardierung infolge eingeschränkter Blutversorgung vermuten.

### **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Die mütterliche Primärinfektion stellt den Hauptrisikofaktor für die vertikale HCMV-Übertragung dar. Bislang sind die maternalen Faktoren, die prädiktiv für eine intrauterine HCMV-Infektion sind, jedoch nicht eindeutig identifiziert. Für Parameter wie Viruslast, spezifische Ig-M-Titer, IgG-Avidität oder die Häufigkeit von HCMV-spezifischen CD4-T-Zellen konnte bei Transmittern und Non-Transmittern kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Lediglich die reduzierte maternale HCMV-spezifische Lymphozytenproliferation scheint mit der Virustransmission zu korrelieren (Revello et al. 2006). Die exakte Bedeutung der humoralen Immunantwort für die intrauterine Transmission ist bislang nicht geklärt. Zwar senkt eine präkonzeptionelle Immunität das konnatale Infektionsrisiko entscheidend, stellt jedoch keinen sicheren Schutz dar.

Der maternofetalen Transmission geht regelmäßig eine Infektion der Plazenta voraus. Als erste Barriere zwischen mütterlicher und kindlicher Zirkulation sind die Trophoblasten von zentraler Bedeutung für die vertikale Transmission und konnten zudem als potentielle Zielzellen der plazentaren HCMV-Infektion identifiziert werden. Erstes Ziel dieser Arbeit war es, ein Trophoblasten-Zellkulturmodell zu entwickeln, welches als Voraussetzungen die Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten, die Aufrechterhaltung der Kultur über einen ausreichend langen Zeitraum und die Verfügbarkeit für zahlreiche Testungen erfüllt. Unter diesen Bedingungen war in einem nächsten Schritt die Untersuchung des HCMV-Infektionszyklus in Trophoblasten-Kulturen vorgesehen. Basierend auf den dabei gewonnenen Erkenntnissen sollte eine Methode entwickelt werden, um die Wirkung von HCMV-Immunsereen auf die Trophoblasten-Infektion zu untersuchen. Dabei war die Etablierung eines

Mikroneutralisationstests zur Analyse der neutralisierenden Immunantwort auf Plazentaebene geplant. Als Grundlage sollte ein Fibroblasten-Mikroneutralisationstest mit einem ELISA-basierten, automatisierten Auswertungsverfahren dienen. Für Vergleichsuntersuchungen war der Einsatz der Methode für zwei weitere, von plazentaren Zelllinien abgeleitete Zelltypen vorgesehen.

Anschließend sollte der entwickelte Mikroneutralisationstest zur Analyse des Effektes von Serumproben primärinfizierter Schwangerer auf die HCMV-Infektion von Trophoblasten angewendet werden. Vor dem Hintergrund der bisher unbefriedigenden Kenntnis von Faktoren und Pathomechanismen, die zu einer maternofetalen Transmission führen, wurde das Ausmaß der Trophoblasteninfektion in Anwesenheit von Transmitterseren und Nontransmitterseren evaluiert. Von Interesse war dabei auch, ob es Hinweise für eine Antikörper-vermittelte Verstärkung der Infektion im Sinne eines Antibody dependent enhancement (ADE) gibt. Für die Entwicklung einer HCMV-Vakzine ist diese Kenntnis von Bedeutung, wie das Beispiel der atypischen Masern nach Immunisierung mit einer Spaltvakzine gezeigt hat.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Untersuchungsmaterial**

#### **2.1.1 HCMV-Immunsereen**

Die Versuche wurden mit Serumproben schwangerer Frauen mit gesicherter, im Lauf der Schwangerschaft erworbener HCMV-Primärinfektion durchgeführt. Die Immunsereen stammten von Patientinnen verschiedener Krankenhäuser und Arztpraxen im süddeutschen Raum und wurden im Labor Prof. G. Enders & Partner, Stuttgart, in den Jahren 1997 bis 1999 gesammelt. Die Seren wurden bis Versuchsbeginn bei -20°C aufbewahrt. Für die Vorversuche, die zur Optimierung der Testmethode durchgeführt wurden, konnten Serumproben HCMV-seropositiver und HCMV-seronegativer Testpersonen aus der diagnostischen Abteilung des Institutes für Medizinische Virologie in Tübingen verwendet werden. Für das Projekt lag ein positives Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen vor.

##### **2.1.1.1 Charakteristika der Serumproben HCMV-primärinfizierter Schwangerer**

Die Proben waren zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Schwangerschaft gewonnen worden, wobei neben der ersten Probe Verlaufskontrollen während der Schwangerschaft bzw. zum Zeitpunkt der Geburt durchgeführt worden waren. Für diese Arbeit standen 15 Seren aus 9 Schwangerschaften zur Verfügung. Dabei waren aus 6 Schwangerschaften je zwei Verlaufs-Seren vorhanden.

Die Diagnose der Primärinfektion war nach Bestimmung von HCMV-IgM und -IgG durch Bestätigungstests gesichert worden, um eindeutig zwischen einer Primärinfektion und falsch-positiven IgM-Resultaten durch lang persistierende IgM-Antikörper oder Virusreaktivierung zu differenzieren. In Neutralisationstests waren die NT-Titer jeder Serumprobe ermittelt worden. Außerdem waren mittels rekombinanter Antigene im Westernblot-Verfahren Antikörper gegen die HCMV-



Oberflächen-Glykoproteine gB und gH bestimmt worden. Das Vorgehen basierte auf der Erkenntnis, dass das Auftreten der neutralisierenden Antikörperantwort bei der HCMV-Primärinfektion einer verzögerten Zeitkinetik unterliegt. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Serumproben zeigten die serologischen Eigenschaften der Primärinfektion: Abfall des IgM-Titers im Verlauf, niedrige NT-Titer bzw NT-Titer-Anstieg im Verlauf oder NT-Serokonversion. Die Proben wurden nach dem maternalen Serostatus für gB und gH bei Geburt in drei Gruppen eingeteilt: anti-gB positiv, anti-gH positiv / anti- gB negativ und anti-gH negativ / anti-gB negativ (Tabelle 1). Der Ausgang der jeweiligen Schwangerschaft im Hinblick auf die diaplazentare Übertragung von HCMV auf das Kind war bekannt. Die Diagnose beim Neugeborenen wurde innerhalb der ersten Lebenswoche durch Virusisolation aus Urinproben oder durch Nachweis in der PCR gestellt; nach Abruption erfolgte der Virusnachweis mittels Zellkultur oder PCR aus verschiedenen Gewebeproben. Die vorgenannten Daten standen für diese Arbeit zur Verfügung, jedoch erfolgte die Durchführung und Auswertung sämtlicher Tests ohne vorherige Informationen über die serologischen Eigenschaften der Proben oder eine potentielle kongenitale HCMV-Infektion.

**Mutter: gB positiv bei Geburt**

| Mutter | Serum | SSW   | CMV-IgG U/I >180 pos | CMV-IgM-ELA >1:128 pos | NT >1:4 pos | rek. Immunoblot |
|--------|-------|-------|----------------------|------------------------|-------------|-----------------|
| 1.3    | 1.3.1 | 8     | 1438                 | 1:4096                 | <1:4        | neg             |
|        | 1.3.2 | 12    | 5672                 | 1:2048                 | 1:4         | (gB, gH)        |
|        | 1.3.3 | T.o.P | 3253                 | 1:1024                 | 1:64        | gB, gH          |
|        | 1.3.4 | T.o.P | 5067                 | 1:512                  | 1:256       | gB, gH          |
| 1.4    | 1.4   | 21    | 3328                 | 1:1024                 | 1:128       | gB              |
| 1.5    | 1.5.1 | 12    | 2194                 | 1:1024                 | 1:8         | gB,gH           |
|        | 1.5.2 | 16    | 2396                 | 1:256                  | 1:64        | gB,gH           |
| 1.6    | 1.6.1 | 16    | 1438                 | 1:4096                 | <1:4        | neg             |
|        | 1.6.2 | 23    | 4689                 | 1:128                  | 1:16        | gB              |
| 1.8    | 1.8.1 | 7     | 1741                 | 1:8192                 | >1:4        | neg             |
|        | 1.8.2 | 9     | 2572                 | 1:4096                 | 1:4         | gH              |
|        | 1.8.3 | 15    | 3404                 | 1:4096                 | 1:16        | gH              |
|        | 1.8.4 | 26    | 1363                 | 1:1024                 | 1:128       | gB,gH           |

**Mutter: gB negativ / gH positiv bei Geburt**

| Mutter | Serum | SSW    | CMV-IgG U/I >180 pos | CMV-IgM-ELA >1:128 pos | NT >1:4 pos | rek. Immunoblot |
|--------|-------|--------|----------------------|------------------------|-------------|-----------------|
| 2.1    | 2.1.1 | 11     | 909                  | 1:8192                 | >1:4        | neg             |
|        | 2.1.2 | 14     | 743                  | 1:4096                 | 1:4         | neg             |
| 2.4    | 2.4.1 | 25     | 1590                 | 1:4096                 | >1:4        | neg             |
|        | 2.4.2 | 29     | 2950                 | 1:1024                 | 1:32        | gH              |
| 2.5    | 2.5   | pp+5Wo | 6050                 | 1:128                  | 1:128       | gH              |

**Mutter: gB negativ / gH negativ bei Geburt (Non-Responder)**

| Mutter | Serum | SSW | CMV-IgG U/I<br>>180<br>pos | CMV-IgM-ELA<br>>1:128<br>pos | NT<br>>1:4 pos | rek.<br>Immunoblot |
|--------|-------|-----|----------------------------|------------------------------|----------------|--------------------|
| 3.1    | 3.1.1 | 9   | 3480                       | 1:4096                       | 1:8            | neg                |
|        | 3.1.2 | 17  | 3404                       | 1:1024                       | 1:64           | neg                |
|        | 3.1.3 | pp  | 1741                       | <1:128                       | 1:128          | neg                |

**Tabelle 1:** Verlaufsseren aus 9 Schwangerschaften mit in der Schwangerschaft erworbener HCMV-Primärinfektion, eingeteilt nach dem mütterlichen Serostatus für gB und gH bei Geburt. (T.o.P.:Termination of Pregnancy)

**2.1.2 Zelllinien und Virusstamm**

Zelllinien:

*Humane Vorhautfibroblasten (HFF):* Humane Vorhautfibroblasten wurden von der diagnostischen Abteilung des Instituts für Medizinische Virologie der Universität Tübingen bereitgestellt.

*Trophoblasten:* Villöse Trophoblasten wurden aus Term-Plazenten isoliert und als Primärzellkultur für die Versuche verwendet. Die Plazenten wurden nach komplikationsloser Geburt oder elektiver Sectio von der Universitäts-Frauenklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Mütter sowie die zuständigen Ärzte waren über das Projekt aufgeklärt und mit der Verwendung der Plazenten für Forschungszwecke einverstanden. Von der Ethikkommission wurde das Projekt geprüft und genehmigt.

*HPEC-A1:* Dieser Zellklon wurde nach Transfektion mikrovaskulärer placentarer Endothelzellen (human placental endothelial cells, HPEC) mit SV40 T-Antigenen selektiert und hinsichtlich seiner Eigenschaften untersucht (Schütz et al. 1997). Die Einbringung der viralen Onkogene resultierte in einer Stimulation des Zellwachstums und einer verlängerten Kultivierbarkeit (bis zu 80 Passagen) gegenüber HPEC. Dabei weist der als HPEC-A1 bezeichnete Klon identische Endothel-spezifische Charakteristika auf wie die Primärzellen. HPEC-A1

wurden freundlicherweise von Dr. P. Friedl (Technische Hochschule Darmstadt) zur Verfügung gestellt.

*AC-1M88*: Als weiterer plazentarer Zelltyp wurde eine Hybridzelllinie aus differenzierten extravillösen Trophoblasten (aus Chorion laeve) und einer Mutante (AC1-1) der Trophoblasten-verwandten Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 (Gaus et al. 1997) verwendet. Durch die Fusion dieser Zelllinien wurde die Proliferationsaktivität der Trophoblasten-verwandten malignen Zelllinie mit den Eigenschaften der differenzierten, proliferationsunfähigen extravillösen Trophoblasten kombiniert und diese somit immortalisiert. Der mit AC-1M88 bezeichnete Hybridzellklon wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H.-G. Frank (Technische Universität Aachen) zur Verfügung gestellt.

Virusstamm:

*VHL-E*: Endothelzell-propagiertes HCMV-Isolat

### **2.1.3 Antikörper und Zellmarker**

*Antikörper (ELISA / Immunfluoreszenz):*

Primärantikörper:

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Anti-HCMV IE Antigen, E 13    | Argene Biosoft / Frankreich              |
| Anti-HCMV E/p52 Antigen, CCH2 | Dako / Glostrup, Dänemark                |
| Anti-HCMV L/MCP Antigen, 28-4 | Dr. William Britt, Birmingham AL,<br>USA |

Sekundärantikörper:

|   |  |
|---|--|
| HRP conj. Goat Fab' Anti-Mouse IgG                  | Protos Immunoresearch /<br>Burlingame, USA |
| Cy 3-conj. F(ab') <sub>2</sub> Goat Anti-Mouse IgG  | Jackson Immunoresearch/<br>USA             |
| FITC-conj. F(ab') <sub>2</sub> Goat Anti-Rabbit IgG | Jackson Immunoresearch                     |

*Zellmarker:*

|   |                           |
|---|---------------------------|
| Mouse Anti-Human HLA Class I Antigen,<br>Klon W6/32 | Dako / Glostrup, Dänemark |
| Mouse Anti-Vimentin, Klon V9                        | Dako                      |
| Mouse Anti-Human Cytokeratin 7,<br>Klon OV-TL 12/30 | Dako                      |
| Rabbit Anti-hCG                                     | Dako                      |
| Rabbit Anti-Human Desmoplakin,<br>Klon AHP 320      | Serotec / Oxford, UK      |
| Dynabeads M-450                                     | Dynal, Hamburg            |

**2.1.4 Reagenzien**

*Zellkultur-Medien:*

|                   |                                 |
|-------------------|---------------------------------|
| MEM               | Gibco BRL / Paisley, Schottland |
| DMEM              | Gibco BRL                       |
| KSFM / Supplement | Gibco BRL                       |
| RPMI 1640         | Gibco BRL                       |
| Ham's F12         | Gibco BRL                       |

*Seren:*

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| Fetales Kälberserum (FCS)  | Gibco BRL |
| Normales Ziegenserum (NGS) | Dako      |

*Lösungen:*

|                                     |                        |
|-------------------------------------|------------------------|
| Hanks' gepufferte Salzlösung (HBSS) | Gibco BRL              |
| Trypsin-EDTA                        | Gibco BRL              |
| Penicillin / Streptomycin-Lösung    | Gibco BRL              |
| Eisessig (100 %)                    | Merck / Darmstadt      |
| Ethanol (99,9 %)                    | Merck                  |
| Triton-X-100                        | Sigma / St. Louis, USA |
| o-Phenylenediamine (OPD) /          |                        |

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Lösungsmittel für OPD                   | Abbott / Wiesbaden                  |
| 1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>      | Abbott                              |
| Percoll                                 | Amersham Pharmacia Biotech /<br>USA |
| Trypsin                                 | Serva / Heidelberg                  |
| Dispase II                              | Roche / Mannheim                    |
| DNase I                                 | Roche                               |
| Ammoniumchlorid                         | Merck                               |
| Dinatrium-EDTA                          | Sigma                               |
| Natriumbicarbonat                       | Gibco BRL                           |
| L-Glutamin                              | Gibco BRL                           |
| Glukose                                 | Merck                               |
| DMSO                                    | Serva                               |
| Vectashield Mounting Medium<br>mit DAPI | Vector / Burlingame, USA            |

### **2.1.5 Geräte**

|   |                      |
|---|----------------------|
| ELISA Processor II plus                           | Behring / Liederbach |
| Lichtmikroskop / Umkehrmikroskop -<br>Axiovert 25 | Zeiss / Jena         |
| Stericult 200 Inkubator                           | Labotect / Göttingen |
| Dynal MPC-6                                       | Dynal                |
| Ricoh X-3000XR-Kamera                             | Ricoh / Frankfurt    |

### **2.1.6 Sonstiges**

|                                    |                               |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 96 Well Mikrotiterplatten          | Nunc / Dänemark               |
| Zellkulturflaschen T 150           | Nunc                          |
| Nylonsieb (100 µm)                 | Becton Dickinson / Heidelberg |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml) | Eppendorf / Hamburg           |
| Agfa RSX-Film                      | Agfa / Köln                   |

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Trophoblasten-Isolierung**

Für die Gewinnung der Trophoblasten-Primärkulturen aus Term-Plazenten diente die von Douglas und King 1989 beschriebene Isolierungsmethode als Grundlage, wobei Modifikationen der Methodik vorgenommen wurden.

#### *Percoll-Gradient*

Zunächst wurde der Percoll-Gradient (70 % - 10 %; Dichtebereich 1,079 – 0,977) vorbereitet. Percoll ist ein Medium für die Dichte-Gradienten-Zentrifugation von Zellen und besteht aus kolloidalem, mit Polyvenyl-Pyrrolidon überzogenem Silizium. Percoll ist nicht permeabel für biologische Membranen, ändert also die Dichte von Zellen nicht. Percoll hat keine toxischen Eigenschaften und ist von niedriger Osmolarität und Viskosität. Die Zentrifugation bewirkt die Ausbildung eines Dichte-Gradienten, der auf die Heterogenität der Partikelgröße im Medium zurückzuführen ist.

Erst wurde eine Stammlösung aus Percoll mit 10 % HBSS (Hanks' gepufferte Salzlösung) hergestellt und mit HBSS weiterverdünnt, so dass Konzentrationsstufen von 70 %, 60 %, 50 % bis 10 % entstanden. Jeweils 6 ml dieser 7 Konzentrationsstufen wurden in einem Plastikröhrchen übereinander geschichtet, wobei mit 70%iger Stammlösung begonnen und die 10%ige Lösung zuletzt aufgeschichtet wurde. Der Gradient wurde bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

#### *Gewinnung von Plazentagewebe und enzymatische Digestion*

Nach mehrmaligem Spülen der Plazenta mit HBSS wurde mit der Bearbeitung des plazentaren Gewebes begonnen. Die Eihaut wurde abpräpariert und ca. 100 g Gewebestücke zwischen Chorion- und Basalplatte herausgeschnitten. Mit dem Skalpell wurde das Gewebe dieser Plazentastücke entlang der Gefäße abgestreift, um durch Eliminierung der Gefäße eine Kontamination mit Endothelzellen zu vermeiden. Das verbliebene Gewebe wurde in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (D-MEM) mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (= komplettes D-MEM)

gesammelt. Durch Spülen mit HBSS wurde Blut ausgewaschen. Die enzymatische Digestion erfolgte mit einer Lösung aus Trypsin (Endkonzentration 7,2 U/ml), Dispase (12 U/ml) und DNase (30 U/ml) in HBSS. Das Gewebe wurde in die Enzymlösung gegeben und 30 Minuten bei 37°C mit dem Magnetührgerät durchmischt. Nachdem sich größere Partikel abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, nachdem jeweils erneut Enzymlösung zu den Gewebsfragmenten gegeben wurde. Die erhaltenen Überstände wurden 10 Minuten zentrifugiert (1000 g) und das Zellpellet in D-MEM resuspendiert. Um Aggregate abzutrennen, wurde die Suspension durch ein Nygonsieb (100 µm) gegeben und erneut zentrifugiert (10 min, 1000 g).

#### *Dichtegradienten-Zentrifugation und Erythrozytenlyse*

Das Zellpellet wurde wieder in D-MEM (ohne Zusätze) aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension behutsam auf den Percoll-Gradienten geschichtet. Nach Zentrifugation (20 min bei 4°C, 1200 g) erscheint in der Mitte des Gradienten eine deutliche weiße Bande (Dichtebereich 1,051- 1,065 g/l), die die Trophoblasten enthält. Diese wurde mit der Pasteur-Pipette abgezogen, in HBSS aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 800 g). Zur Erythrozytenlyse wurde das Pellet in Lysispuffer (150 mM Ammoniumchlorid, 0,1 mM Dinatrium-EDTA, 10 mM Na-Bikarbonat in Aqua dest.) aufgenommen. Nach 8-minütigem Schwenken auf dem Taumler wurde wieder zentrifugiert (5 min, 800 g) und das Pellet anschließend zweimal mit HBSS gewaschen (5 min, 800 g).

#### *Negativ-Selektion*

Vor der Negativ-Selektion wurde die Gesamtzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt, um die benötigten Antikörper-Mengen zu berechnen. Die Zellsuspension wurde auf  $4 \times 10^6$  Zellen / ml HBSS verdünnt. Der Primärantikörper W6/32 wurde im Verhältnis von je 20 µl Antikörper pro  $4 \times 10^6$  Zellen zugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Antikörper bindet an MHC-I-positive Zellen, die eine Kontamination der Trophoblasten-Zellsuspension darstellen. Dabei macht man sich die Eigenschaft zunutze, dass Trophoblasten als einziger plazentarer Zelltyp keine klassischen MHC-I-



Moleküle exprimieren. Nach Zentrifugation (5 min, 400 g) wurde zweimal mit HBSS gewaschen (5 min, 350 g) und die Zellen in HBSS resuspendiert. Die benötigte Menge Dynabeads wurde berechnet (Verhältnis 5 Dynabeads pro Zielzelle), wobei angenommen wurde, dass kontaminierende MHC-I-positive Zellen etwa 10 % - 15 % der Gesamtzellzahl ausmachen. Dynabeads bezeichnen einen magnetgekoppelten goat-anti-mouse-Sekundärantikörper. Mittels des magnetischen Partikel-konzentrators (MPC-6) können die durch magnetgekoppelte Antikörper gebundenen Zellen einer Suspension entfernt werden, da sie sich in Richtung des Magnetfeldes sammeln. Die übrige Suspension kann asserviert werden und enthält die Zielzellen.

Die benötigte Menge Dynabeads wurde nach vorheriger Resuspension entnommen und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Die Dynabeads wurden zunächst gewaschen, um das in der Stammlösung enthaltene  $\text{NaN}_3$  zu entfernen. Das Gefäß mit der gewünschten Menge Dynabeads wurde hierzu für 5 min in den Magneten gestellt und dann die Dynabead-freie Flüssigkeit an der vom Magneten abgewandten Seite abgezogen und verworfen. Anschließend wurden die Dynabeads in 1 ml HBSS aufgenommen, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und auf 10 ml mit HBSS aufgefüllt. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die Dynabeads wurden dann wieder in HBSS aufgenommen, zur Zellsuspension gegeben und das Gemisch 30 Minuten auf dem Taumler auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension in den Magneten gestellt und die Flüssigkeit, die nun die nicht magnetisch gebundenen Zellen bzw. die MHC-I-negativen Trophoblasten enthält nach 5 min abgezogen. Zur Optimierung der Reinheit wurde die Suspension nochmals in den MPC-6 gegeben und der Vorgang wiederholt.

#### *Aussaat und Einfrieren der Trophoblasten*

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Suspension 5 Minuten bei 800 g zentrifugiert, die Zellen in Zellkultur-Medium aufgenommen und auf 96-Well Platten mit flachem Boden ausgesät. Alternativ konnten die Zellen in kaltem FCS aufgenommen werden und nach Zugabe von Einfriermedium (3 Teile

20%ige Glukose in RPMI1640 + 2 Teile Dimethylsulfoxid, DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

### *Reinheitsprüfung*

Um die Reinheit der Trophoblasten-Primärkulturen zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von Trophoblasten und kontaminierenden Zellen vorgenommen. Dabei dienten Anti-Cytokeratin 7 für Trophoblasten und Anti-Vimentin für mesenchymale Zellen als Primär-Antikörper und ein Cy-3-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment als Sekundär-Antikörper. Durch Auszählen der jeweils positiven Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop wurde der Prozentsatz von villösen Trophoblasten und kontaminierenden Zellen ermittelt.

## **2.2.2 Zellkultur**

### **2.2.2.1 Kultur von villösen Trophoblasten**

Die Trophoblasten wurden nach Isolierung und Bestimmung der Zellzahl entweder frisch auf 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät oder es wurden eingefrorene Zellen aufgetaut und ausgesät. Bis zur Festlegung der notwendigen Zellzahl / Well wurde die Aussaat mit unterschiedlicher Dichte ( $10^4$  bis  $3 \times 10^5$  pro Well) getestet. Für die Kultivierung von Trophoblasten wurden verschiedene Zellkulturmedien getestet: Iscove's Minimum Essential Medium (MEM), Dulbecco's MEM und Keratinozyten-serumfreies Medium (KSFM) unter jeweils Zugabe von fetalem Kälberserum in verschiedenen Konzentrationen. Die Kultivierung erfolgte im CO<sub>2</sub> Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.2.2.2 Kultur von humanen Vorhautfibroblasten (HFF)**

Humane Vorhautfibroblasten wurden in Minimum Essential Medium mit Zusatz von Glutamin, 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (= komplettes MEM) in Kulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, wobei das Kulturmedium alle 48 Stunden erneuert wurde. Nach Ausbildung einer konfluenten Zellschicht konnten die Zellen fortlaufend 1:2 passagiert werden. Vor der Ernte der Zellen wurde der Zellrasen mit HBSS gewaschen, um FCS-Reste zu entfernen, bevor

eine 2-3 minütige Inkubation mit Trypsin-EDTA bei 37°C erfolgte. Das Trypsin löst die Zellen enzymatisch vom Boden der Zellkulturflasche. Nach Auswaschung des Trypsins und Aufnahme der Zellen in komplettem MEM wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen konnten auf einer 96-Well-Platte in definierter Dichte ( $10^4$  Zellen / Well) ausgesät werden. Verwendet wurden Zellen zwischen der 15. und 20. Passage.

#### **2.2.2.3 Kultur von AC-1M88**

Die Zelllinie AC-1M88 wurde mit dem Kulturmedium Ham's F12 mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. AC-1M88 konnten wie HFF und HPEC-A1 fortlaufend 1:2 passagiert werden. Für die Versuche wurden Zellen der 20. - 30. Passage verwendet. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Das Nährmedium wurde nach 24 Stunden erneuert.

#### **2.2.2.4 Kultur von HPEC-A1**

HPEC-A1 der 10. - 15. Passage wurden mit RPMI 1640 mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Versuche wurden HPEC-A1 ebenfalls mit einer Dichte von  $10^4$  Zellen pro Well ausgesät.

### **2.2.3 Virusanzucht und Virustitration**

#### **2.2.3.1 Virusanzucht**

Konfluente HFF-Monolayer wurden mit dem HCMV-Isolat VHL-E infiziert, indem infektiöser Überstand einer produktiv infizierten Kultur in einem geringen Volumen Kulturmedium auf den Monolayer überführt und 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Durch mehrmaliges Schwenken der Kulturflasche wurde der Flüssigkeitsfilm neu verteilt. Zur weiteren Kultivierung wurde das Medium dann auf das übliche Volumen aufgefüllt. Nach 5 bis 7 Tagen, als die Zellen

durchinfiziert waren und zu 89 – 90 % einen zytopathogenen Effekt aufwiesen, konnte der Überstand zur Weiterinfizierung oder zum Anlegen von Virusstocks verwendet werden.

### **2.2.3.2 Anlegen von Virusstocks und Virustitration**

Zum Anlegen eines Virusstocks wurde der Überstand der durchinfizierten Kultur abgenommen und, um Zellbestandteile abzutrennen, 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der zellfreie, virushaltige Überstand wird abgenommen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Um die Anzahl der infektiösen Einheiten des virushaltigen Kulturüberstandes zu bestimmen, wurde eine doppelt logarithmische Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  -  $10^{-9}$  in Kulturmedium) hergestellt. Mit den Verdünnungen wurden konfluente HFF-Kulturen auf 96-Well-Platten infiziert und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Ermittlung des Virustiters erfolgte durch den Nachweis von HCMV-IE-Antigen mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die durchschnittliche Anzahl der infektiösen Einheiten der Stammsuspension (n) wird ermittelt aus der letzten Verdünnung ( $10^{-x}$ ), bei der noch wenige Kerne (y) in der Immunfluoreszenz IE-positiv sind nach der Formel  $n = y \cdot 10^x$ .

### **2.2.4 Bestimmung der Neutralisationskapazität durch einen Mikroneutralisationstest**

Der Mikroneutralisationstest stellt ein schnelles und gut reproduzierbares Auswertungssystem dar, mit dem die Hemmung der Infektiosität eines Virus durch neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden kann. In der Literatur sind Mikroneutralisationstests von vielen Autoren beschrieben worden (Rasmussen et al. 1984, Gonczol et al. 1986, Braun und Schacherer 1988, Andreoni et al. 1989), auf deren Grundlage dieser Test mit Modifikationen durchgeführt wurde. Um die Neutralisationskapazität von Serumproben zu ermitteln, wird zunächst das Antigen-Antikörper-Gemisch (Virus und Serumverdünnung) nach einer definierten Inkubationszeit zu Zellkulturen gegeben, welche mit dem Virus infizierbar sind. Ob und wieviel nicht-

neutralisiertes bzw. infektiöses Virus noch im Neutralisationsgemisch vorhanden ist, kann durch quantitativen Nachweis von Virusproteinen als Indikator für das Ausmass der Infektion gemessen werden. Durch Mitführen einer Positivkontrolle (gleiche Menge Virus ohne Serum), die die maximale Infektion repräsentiert, kann die Neutralisationskapazität der jeweiligen Serumprobe errechnet werden.

#### **2.2.4.1 Probenvorbereitung**

*Komplementinaktivierung:* Die Serumproben wurden 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert, um enthaltenes Komplement zu inaktivieren.

*Plattenbeschichtung:* Zur Beschichtung wurden die Mikrotiterplatten für eine Stunde bei 37°C mit einer 0,1%igen Gelatinelösung inkubiert und die Lösung anschließend abgezogen. Ebenso wurde mit Laminin und Kollagen verfahren. Die Zellen wurden unmittelbar danach auf die beschichteten Platten ausgesät.

*Ansatz und Inkubation der Neutralisationsgemische:* In sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde von der zu untersuchenden Serumprobe eine Verdünnungsreihe von 1:50 bis 1:6400 hergestellt. Dazu wurde erst eine 1:2 bis 1:128 Serum-Vorverdünnungsreihe aus Serumprobe und Medium (ohne Zusätze) hergestellt, aus der die Serumverdünnungen für die Ansätze entnommen wurden. Zu den jeweiligen Serumverdünnungen wurde eine konstante Menge Medium ohne Zusätze sowie eine konstante Menge an titriertem infektiösem HCMV-VHL-E gegeben, entsprechend einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 10. Der Ansatz für ein Well enthielt beispielsweise 1 µl Serum bzw. Serumverdünnung, 40 µl Virus und 9 µl Medium. So erhielt man bei einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Well abhängig von der zugegebenen Serumverdünnung Verdünnungsstufen von 1:50 bis 1:6400. Zur Bestimmung der maximalen Infektion wurde eine Positivkontrolle angesetzt, die die gleiche Menge Virus, aber kein Serum enthielt. Wie bei den Serum-Verdünnungsansätzen wurde 1 % FCS zugegeben sowie Medium, um das Zielvolumen zu erreichen. Die Negativkontrolle enthält Medium mit 1 % FCS ohne Serum oder Virus. Für jede Verdünnungsstufe sowie für Positiv- und

Negativkontrolle wurden Dreifachansätze angelegt. Alle Ansätze wurden für 4 h bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.4.2 Infektion der Zellen**

Die für 16 h (HFF) oder 48 h (plazentare Zelltypen) auf der Mikrotiterplatte kultivierten Monolayer wurden durch einmaliges Waschen mit HBSS von FCS-Resten gereinigt. Die Neutralisationsgemische aus Virus und Serumverdünnung wurden aufpipettiert und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. HFF konnten nach 16 h fixiert und gefärbt werden, während Trophoblasten, AC-1M88 und HPEC-A1 für 48 h inkubiert wurden. Die Infektion wurde durch Fixierung mit Eisessig oder Paraformaldehyd gestoppt, nachdem das Inkubationsgemisch durch saches Abklopfen entfernt wurde.

#### **2.2.4.3 Fixierung und Permeabilisierung**

*Fixierung:* 1%iges Paraformaldehyd (200 µl/Well) oder 5%iger Eisessig (5 Teile Eisessig + 95 Teile Ethanol, 100 µl/Well) wurde auf den Monolayer gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die Zellen dreimal mit HBSS (200 µl/Well) gewaschen.

*Permeabilisierung:* Anschließend folgte die Permeabilisierung der Zellen mit Triton-X-100 (0,01 %, 50 µl/Well). Die Lösung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur in den Wells belassen. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit HBSS konnte mit der Färbung begonnen werden.

### **2.2.5 Immunzytochemische Färbung**

#### **2.2.5.1 Immunzytochemische Färbung viraler Antigene**

Vor Etablierung der schnelleren und effizienteren ELISA-basierten Färbemethode wurde der Prozentsatz der infizierten Zellen jeder Verdünnungsstufe durch immunzytochemische Färbung ermittelt. Die Färbemethode beruht auf der Bindung HCMV-spezifischer Primärantikörper, die

gegen virale Antigene gerichtet sind, und Detektion dieser Antikörper durch ein Cy3-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment (Indocarbocyanin-Konjugat) als Sekundärantikörper.

Um unspezifische Bindungen des Konjugates zu minimieren, wurde die Platte mit 20%igem Normalem Ziegenserum (Normal Goat Serum, NGS) 30 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde einmal gewaschen und der Primärantikörper zugegeben. Als Primärantikörper für die Proteine der verschiedenen Replikationsphasen von HCMV wurden der Anti-HCMV-IE Antikörper E13 (1:100 verdünnt), der Anti-HCMV-E Antikörper CCH2 (1:4 verdünnt) und der Anti-HCMV-L Antikörper 28-4 (1:2 verdünnt) verwendet. Die fixierten Zellen wurden mit dem Primärantikörper (100 µl/Well) eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit HBSS gewaschen. Es folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper (1:400 verdünnt), danach wurde wieder dreimal mit HBSS gewaschen. Zuletzt wurde Vectashield Mounting Medium mit DAPI (50 µl/Well) zugegeben und nach einer Minute abgezogen. Durch die DAPI-Färbung werden alle Kerne gefärbt und erscheinen unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop mit DAPI-Filter blau. Die Cy3-positiven Kerne erscheinen unter dem Rodamin/TRITC-Filter rot. Mikroskopisch konnten so infizierte und nicht-infizierte Zellen erkannt werden. Die Relation von IE-, E- oder L-positiven Kernen zur Gesamtzahl der Kerne wurde visuell durch Zählen der jeweils angefärbten Kerne unter dem Immunfluoreszenzmikroskop bestimmt.

Die Neutralisationskapazität konnte errechnet werden, indem vom Prozentsatz der infizierten Zellen im maximalen Infekt der Prozentsatz der infizierten Zellen der jeweiligen Serumverdünnungsstufe subtrahiert wird. Der Wert steht für die Verminderung des maximalen Infektes durch neutralisierende Antikörper je nach Neutralisationskapazität der Serumverdünnung. Die relative Neutralisationskapazität ergibt sich, wenn diese auf den maximalen Infekt bezogen wird.

### **2.2.5.2 Immunzytochemische Färbung zellulärer Antigene**

Für die Reinheitsprüfung und Charakterisierung der Trophoblasten-Kulturen wurden anhand immunzytochemischer Färbung zelluläre Antigene sichtbar gemacht. Die Vorgehensweise ist identisch wie die Färbung viraler Antigene, wobei die Primärantikörper entsprechend der nachzuweisenden zellulären Antigene gewählt wurden: Als Marker für Trophoblasten diente ein monoklonaler Antikörper gegen Cytokeratin 7 (1:800 verdünnt), als Marker für die Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten wurden Antikörper gegen Beta-hCG (1:20 verdünnt) und Desmoplakin (1:10 verdünnt) eingesetzt. Zur Detektion von Mesenchymzellen wurde Anti-Vimentin (1:800 verdünnt) verwendet. Mit Fluorescein (FITC)- oder Indocyanin (Cy3)-konjugierten F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten als Sekundärantikörper konnte der Anteil der angefärbten Zellen lichtmikroskopisch bestimmt werden.

### **2.2.6 ELISA zum Nachweis HCMV-infizierter Zellen**

Der Nachweis HCMV-infizierter Zellen im ELISA beruht ebenfalls auf der Bindung von Primärantikörpern, die gegen HCMV-IE-Antigen gerichtet sind, und deren Färbung durch Sekundärantikörper. Es wurde ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase konjugierte Fab'-Fragmente) und als Substrat o-Phenylendiamin (OPD-Lösung) verwendet. O-Phenylendiamin bildet nach Umwandlung durch Peroxidase einen gelben Farbstoff, der durch photometrische Messung der Extinktion quantifiziert werden kann.

Nach Vorblockieren mit NGS und einmaligem Waschen folgte die Beschichtung mit dem Primärantikörper E13 (50 µl/Well, 1:2000 mit 1%igem NGS verdünnt). Für 1 h wurde die Mikrotiterplatte bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit HBSS gewaschen um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Dann erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers (50 µl/Well; 1:1000 mit HBSS verdünnt) und eine weitere Inkubation für 1 h bei 37°C. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde o-Phenylendiamin (OPD-Lösung, 100 µl/Well) als Substrat zugegeben. Für die Entwicklung der Färbung wurde die Mikrotiterplatte



25 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbereaktion wurde optisch kontrolliert und mit 250 µl/Well 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt, wenn die Ansätze mit maximaler Infektion eine tiefgelbe Färbung hatten. Durch die Zugabe von 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fand ein Farbumschlag nach orange statt.

### **2.2.6.1 Rechnerische Auswertung und graphische Darstellung**

Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktionen im ELISA-Reader (Behring) bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die relative Neutralisationskapazität für jede Serumverdünnungsstufe wurde wie folgt berechnet (Mangin 2004): Aus den Dreifachwerten für die jeweiligen Verdünnungsstufen sowie für Positiv- und Negativkontrolle wurden zuerst die Mittelwerte berechnet. Die Extinktion der Negativkontrolle kann als infektionsunabhängiger Hintergrund angesehen werden. Eine Erhöhung der Extinktion wird schon allein durch die im Well befindlichen Zellen verursacht. Um die rein infektionsbedingten Werte zu erhalten, wurden die Extinktionswerte von Serumverdünnungen ( $x_{\text{serum}}$ ) und Positivkontrolle ( $x_{\text{max Inf.}}$ ) um diese Hintergrundextinktion ( $x_k$ ) korrigiert. Durch Subtraktion der Hintergrundkorrigierten Extinktion der Serumverdünnungen ( $x_{k\text{Serum}}$ ) von der Hintergrundkorrigierten Extinktion im maximalen Infekt ( $x_{k\text{max Inf.}}$ ) erhält man die Neutralisationskapazität. Setzt man die Neutralisationskapazität ins Verhältnis zum maximal möglichen Infekt ( $x_{k\text{max Inf.}}$ ) ergibt sich die relative Neutralisationskapazität ( $x_{k\text{max Inf.}} - x_{k\text{Serum}} / x_{k\text{max Inf.}}$ ).

Für jedes Serum wurde die relative Neutralisationskapazität in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe in einem Kurvendiagramm dargestellt. Eine relative Neutralisationskapazität von 1 bedeutet, dass eine komplette Neutralisation stattgefunden hat. Fehlende neutralisierende Wirkung bzw. unbeeinflusste Infektion entspricht dem Wert Null. Um die Neutralisationskapazität der einzelnen Serumproben vergleichen zu können, wurde jeweils der 50 %-Neutralisationstiter (NT-Titer) ermittelt, d. h. die Verdünnungsstufe mit der relativen Neutralisationskapazität von 0,5.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Methodenetablierung einer Trophoblasten-Primärkultur für HCMV-Infektionsstudien**

Ziel dieser Arbeit war es, ein organotypisches Zellkulturmodell zur Gewinnung neuer Erkenntnisse über die plazentare HCMV-Infektion zu entwickeln. Da die Synzytiotrophoblasten die erste Barriere für die intrauterine Übertragung von HCMV bilden, war die Wirkung der humoralen maternalen HCMV-Immunantwort auf eine auf die Infektion dieser Plazentazellen von zentralem Interesse.

##### **3.1.1 Trophoblastenisolierung und –Primärkultur**

Bei der Trophoblasten-Isolierung wurde das Prinzip der Negativ-Selektion verwendet. Dabei werden kontaminierende Zellen durch Antikörperbindung aus der Trophoblasten-Zellsuspension entfernt. Hier kam der gegen MHC-Klasse-I-positive Zellen gerichtete Antikörper W6/23 zum Einsatz. Villöse Trophoblasten exprimieren keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche und sind Vimentin-negativ. Dies unterscheidet sie von mesenchymalen Stromazellen. Extravillöse Trophoblasten exprimieren ein nicht-klassisches MHC-Klasse-I-Molekül (HLA-G), sodass dieses Unterscheidungsmerkmal auch für die Abtrennung der extravillösen Trophoblasten genutzt werden kann. Ein Vorteil der Negativ-Selektion ist, dass die villösen Trophoblasten nicht durch Antikörperbindung alteriert werden.

Mit der angewandten Isolierungsmethode konnte aus ca. 100 g Plazentagewebe ein Zellertrag von  $15 - 25 \times 10^6$  villösen Trophoblasten erzielt werden. Der Prozess der Isolierung aus Term-Plazenten bis zur Anlage einer Primärkultur dauerte durchschnittlich 8 h. Die Aussaat der Zellen erfolgte entweder direkt nach Isolierung oder nach Aufbewahrung bei  $-180^\circ\text{C}$ . Bei der Kultivierung von Trophoblasten, die bei  $-180^\circ\text{C}$  gelagert waren, war ein Verlust von ca. 10 % vitaler Zellen zu verzeichnen. Dennoch war eine Kultivierung ebenso wie bei Verwendung von frischen Zellen möglich.

### *Reinheitsprüfung und Charakterisierung*

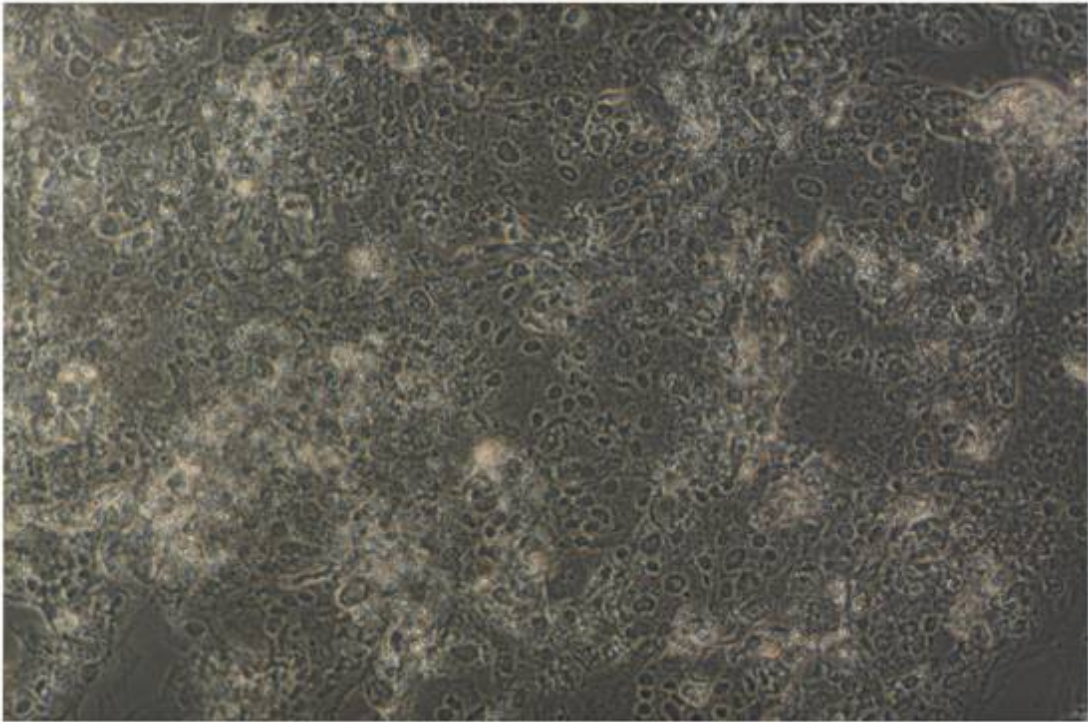
Als Zielantigene für die Reinheitsprüfung mit indirekter Immunfluoreszenz dienten Cytokeratin 7 als hochspezifischer Trophoblasten-Marker und Vimentin als Marker für mesenchymale Zelltypen. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy-3-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment (Indocyanin-Konjugat) verwendet. Die Trophoblasten-Kulturen wiesen eine Reinheit von > 95 % auf. Entsprechend war der Anteil Vimentin-positiver Zellen < 5 %.

Lichtmikroskopisch waren ab dem dritten Tag in Kultur Synzytien zu erkennen (Abb. 3). Intrazelluläres Beta-hCG ist ein Marker für Synzytiotrophoblasten und konnte durch immunzytochemische Färbung ab Tag 3 in zunehmender Ausprägung in den Kulturen nachgewiesen werden. Am Tag 4 in Kultur konnte eine ausgedehnte Synzytialisation demonstriert werden (Abb. 4). Als weiterer Parameter für die Synzytialisation konnte der Verlust von Zellgrenzen durch einen mit der Zeit in Kultur abnehmenden Gehalt an Desmoplakin gezeigt werden.

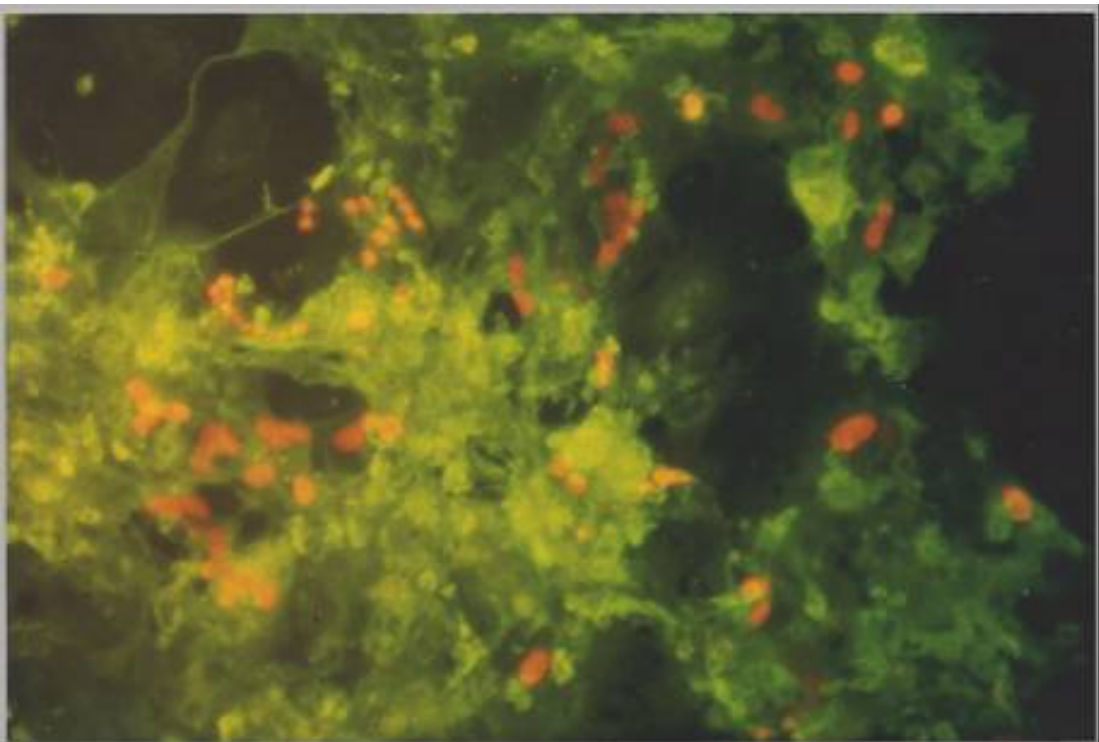
### *Zellkulturbedingungen, Differenzierung und Zellalterung*

Die Differenzierung der mononukleären Cytotrophoblasten in multinukleäre Synzytiotrophoblasten erfolgte ab dem 3. Tag in Kultur und war am 6. Tag abgeschlossen. Die Primärkulturen konnten über einen Zeitraum von ca. 10 Tagen aufrechterhalten werden, wobei die Seneszenz der Zellen am Tag 7 – 10 beginnt.

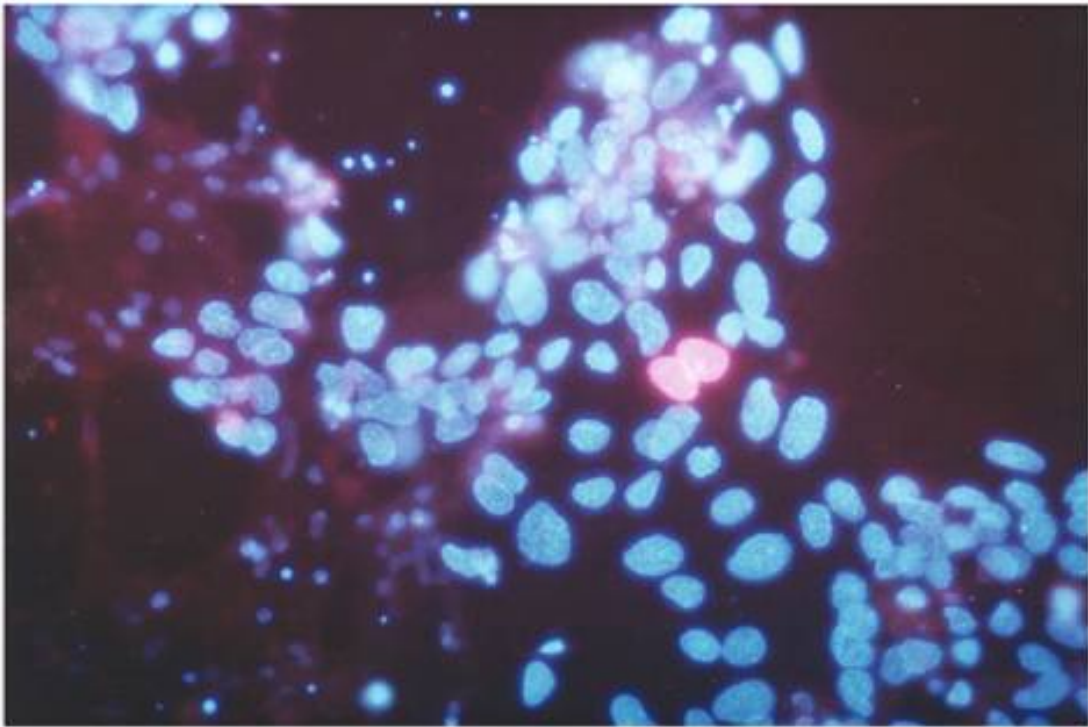
Für die Anzucht der TB wurden verschiedene Kulturmedien getestet: Iscove's MEM, Dulbecco's MEM und Keratinocyten-SFM unter jeweiliger Zugabe von fetalem Kälberserum in verschiedenen Konzentrationen. Für das Gedeihen der Trophoblasten und die Ausbildung von Synzytien erwies sich serumfreies Keratinocyten-Medium (KSFM) mit Zugabe von 20 % FCS als am besten geeignet. Dieses Medium wurde mit bovinem Hypophysen-Extrakt und rekombinatem Epidermal Growth Faktor (EGF) supplementiert. EGF fördert die Synzytialisation. Alle 24 h wurden die Kulturüberstände gewechselt. Probleme durch bakterielle Kontamination traten nicht auf.



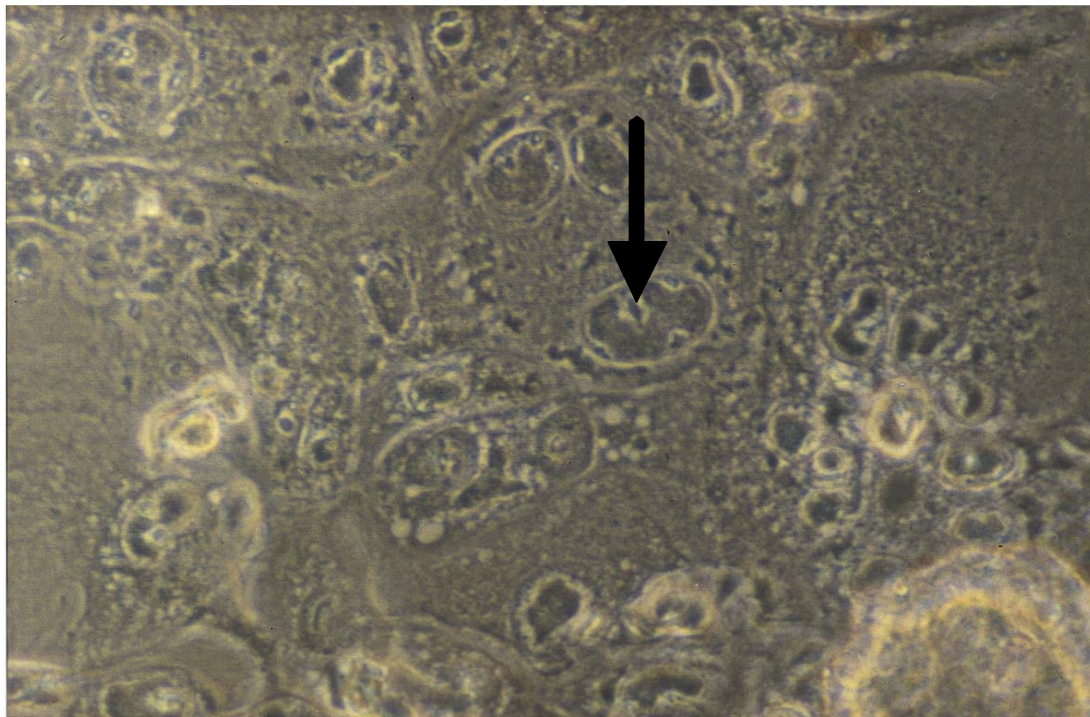
**Abbildung 3:** Primärkultur konfluenter multinukleärer Syncytiotrophoblasten in vitro am Tag 5 nach Isolierung (Phasenkontrastaufnahme, 40x).



**Abbildung 4:** Nachweis von HCMV-IE- und Beta-hCG in Synzytiotrophoblasten in vitro am Tag 4 post infectionem (Doppelimmunfluoreszenzaufnahme, 200 x). Antigene: Beta-hCG (rabbit-anti-human, Dako 1:20, FITC); HCMV-IE72 (E13, mouse-anti-human 1:100, Cy3)



**Abbildung 5:** Nachweis von HCMV-IE-Antigen (nukleär) in Synzytiotrophoblasten in vitro am Tag 2 p.i. (Doppelimmunfluoreszenzaufnahme, 200 x). Antikörper E13 (mouse-anti-human CMV-IE, 1:100), Cy3 (rot). Eindeckung in DAPI (Vectashield, blaue Fluoreszenz nukleärer DNA)



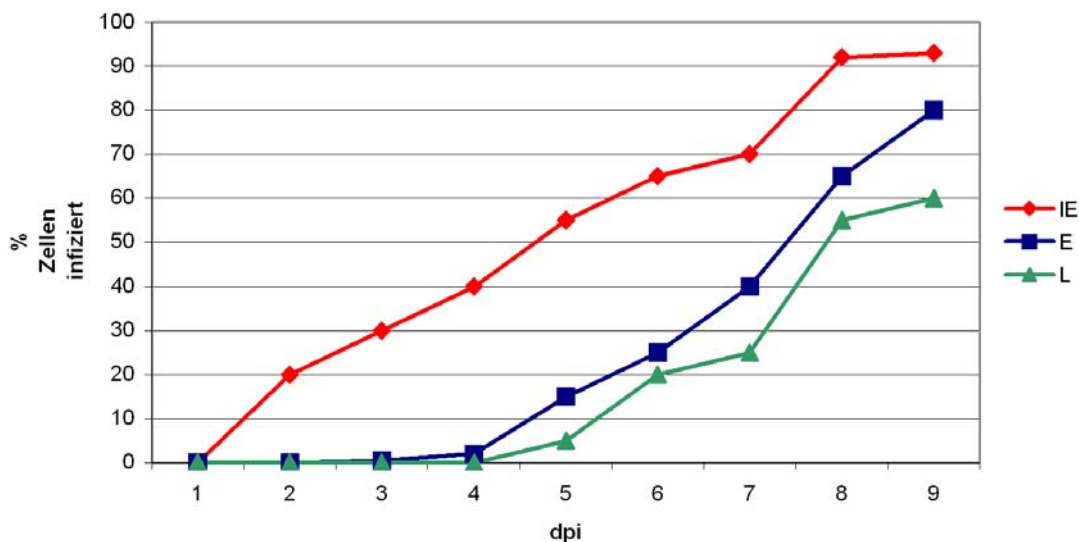
**Abbildung 6:** Nachweis von HCMV Einschlusskörperchen in primären Trophoblasten am Tag 7 in Kultur (Phasenkontrastaufnahme, 400 x)

### **3.1.2 Untersuchung der HCMV-Antigenkinetik von HCMV-infizierten Trophoblasten-Primärkulturen**

Um den optimalen Zeitpunkt für die Messung der Neutralisationskapazität von HCMV-Antisera bei infizierten Trophoblasten festlegen zu können, wurde die Antigenkinetik der HCMV-Replikation in Trophoblasten untersucht. Trophoblasten-Kulturen und Kulturen humaner Vorhautfibroblasten, welche als Standard-Zelltyp für die HCMV-Kultivierung dienen, wurden mit dem Endothelzell-propagierten HCMV-Isolat VHL-E infiziert. Die Replikationsphasen von HCMV wurden in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. In Übereinstimmung mit früher publizierten Daten (Halwachs-Baumann et al. 1998) resultierte die Infektion von Trophoblasten, verglichen mit HFF, in einer verzögerten Replikationskinetik von HCMV. Nach einer Infektion mit der „multiplicity of infection“ (MOI) von 1 konnte die intrazelluläre Expression von HCMV-IE-Antigenen ab 18 – 24 h p.i. nachgewiesen werden (Abb. 5). E-Antigene traten ab 36 - 48 h p. i. und L-Antigene zwischen Tag 3 und 4 p.i. auf. Die Ausbreitung von HCMV war effizient und am Tag 9 in Kultur waren > 95 % der Kerne IE-positiv, ca. 80 % waren E-positiv und ca. 65 % exprimierten L-Proteine (Abb. 7). Die produktive Replikation von HCMV in Trophoblasten ließ sich zudem durch den Nachweis von HCMV-Einschlusskörperchen demonstrieren. Diese konnten in der Kultur ab Tag 5 beobachtet werden (Abb. 6). Bei einer MOI von 10 waren 25 h p.i. 95 % der Zellen infiziert, gemessen an der Zahl IE-positiv gefärbter Kerne (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Zellen standardmäßig mit einer MOI von 10 infiziert. Als Zeitpunkt für die Messung der Neutralisationskapazität im Mikroneutralisationsassay wurde 48 h p.i. gewählt.

Die ausgeprägte Anhäufung von HCMV-Proteinen in Synzytien führte zur Schwellung und Auflösung, sodass eine lytische Auswirkung der Infektion von Trophoblasten angenommen werden kann. Allerdings konnte die Degeneration der Synzytien auch in nicht-infizierten Kontroll-Kulturen abhängig von der Zeit in Kultur beobachtet werden, wenn auch von geringerem Ausmaß. Der Nachweis von infektiösem freiem Virus im Überstand infizierter Trophoblasten-Kulturen

gelang durch den Transfer von gefiltertem Überstand auf HFF-Kulturen. Hier zeigte sich der HCMV-typische zytopathische Effekt (CPE).



**Abbildung 7:** Antigenkinetik für HCMV Isolat VHL-E (MOI 1); Antikörper: HCMV-IE (IE; Antikörper E13, mouse-anti-human CMV-IE, 1:100), HCMV-E (E/p52; Antikörper CCH2, Dako, mouse-anti-human, 1:4), HCMV-L (L/pp150; Antikörper 28-4, mouse-anti-human, 1:2). Nach Infektion mit einer MOI von 10 sind 2 Tage p.i. > 95% der Kerne IE-positiv (Daten nicht gezeigt).

### **3.2 Etablierung eines ELISA-basierten Mikroneutralisationstests für plazentare Zelllinien**

Mittels eines reproduzierbaren und effizienten Testsystems sollte der Neutralisationseffekt von HCMV-Antiseren auf die Infektion von villösen Trophoblasten sowie einer plazentaren Endothelzelllinie (HPEC-A1), einer den extravillösen Trophoblasten-verwandten Zelllinie (AC-1M88) und HFF als Standard-Zelltyp untersucht werden. Für eine möglichst ökonomische Verwendung der in geringen Mengen zur Verfügung stehenden Serumproben primärinfizierter Schwangerer erfolgte die Testung durch einen Mikroneutralisationstest. Für die Untersuchung der antiviralen neutralisierenden Antikörper-Aktivität waren hierbei für einen Versuch im Dreifachansatz 4 µl Serum für Serumverdünnungen von 1:50 bis 1:6400 ausreichend, sodass zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit fast immer wiederholte Testungen der einzelnen Serumproben möglich waren, mindestens zweimal und zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

In Vorversuchen wurde die Neutralisationskapazität konventionell am Lichtmikroskop mit Immunfluoreszenz bestimmt, indem durch Auszählen die Relation der IE-positiven Kerne zur Gesamtzahl der Kerne ermittelt und auf den maximalen Infekt bezogen wurde. Dieses Vorgehen ist jedoch aufgrund des enormen Zeitaufwandes für die Durchführung einer großen Anzahl von Testungen mit Mehrfachansätzen ungeeignet. Deshalb sollte zur Automatisierung der Auswertung eine ELISA-basierte Methode eingesetzt werden.

### ***3.2.1 Optimierung und Standardisierung von Voraussetzungen und Ablauf des Mikroneutralisationstests***

In Vorversuchen wurde die Durchführung des Mikroneutralisationstests unter Berücksichtigung der Eigenschaften der jeweiligen Zelllinien optimiert. Hierbei sollten möglichst gleichmäßige, konfluente Zellrasen sowie eine gleichmäßige Infektion der Zellen erzielt werden, da nur so aussagekräftige Ergebnisse im ELISA zu erwarten waren.

#### *Zellkultur- und Infektionsbedingungen*

Bei den Trophoblasten zeigten eine Aussaat in hoher Dichte mit  $3 \times 10^5$  Zellen / Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte und eine Kultivierung über 48 h bis zur Infektion die besten Ergebnisse, d. h. die Ausbildung eines konfluenten, adhärenen Zellrasens mit beginnender Synzytialisierung. Bei geringerer Zellzahl oder kürzerer Zeit in Kultur waren keine ausreichende Konfluenz und Adhärenz gegeben. Die Kulturen wurden jeweils vor dem potentiellen Infektionszeitpunkt lichtmikroskopisch beurteilt. Generell musste mit besonderer Sorgfalt darauf geachtet werden, den Zellrasen während der Test-Schritte nicht zu beschädigen. Für HPEC-A1, AC1-M88 und HFF war eine Aussaat mit  $10^4$  Zellen / Well ausreichend, wobei die beiden plazentaren Zelllinien für die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens, ähnlich wie bei den Trophoblasten, bis zum Infektionszeitpunkt 48 h kultiviert wurden. HFF konnten nach 16 h infiziert werden.



Die Auswirkung verschiedener Beschichtungen der Mikrotiterplatten auf Adhäsion und Zell-Morphologie der Trophoblasten wurde ebenfalls untersucht. Die Beschichtungen mit Gelatine, Laminin und Kollagenen zeigten jedoch keine Vorteile. Auf eine Beschichtung wurde daher verzichtet. Die Vorinkubation von Serum und Virus wurde wie von Mangin 2004 beschrieben über 4 Stunden durchgeführt, um eine ausreichende Zeit für die Neutralisation des Virus durch die im Serum vorhandenen Antikörper zu gewährleisten.

#### *Komplementinaktivierung*

Zur Evaluierung eines möglichen Effektes von Komplement auf die Neutralisationskapazität der Seren wurden Testungen mit und ohne Komplement durchgeführt. Da keine Auswirkung festgestellt werden konnte, erfolgte zur Standardisierung die Komplement-Inaktivierung jedes Serums vor Versuchsbeginn.

#### *Fixierung*

Zur Fixierung zeigte die Verwendung von 5%igem Eisessig im Vergleich zu Paraformaldehyd die besten Ergebnisse mit nur minimaler Ablösung insbesondere der Trophoblasten.

### **3.2.2 Etablierung und Optimierung des ELISA**

Für die wesentlich schnellere, effizientere und Untersucher-unabhängige Auswertung im ELISA diene die von Mangin 2004 auf HFF etablierte Methode als Grundlage. Der Nachweis und die Quantifizierung der IE-Antigenexpression durch ELISA beruht wie die lichtmikroskopische Auswertung der immunzytochemischen Kernfärbung auf der Bindung HCMV-spezifischer Primärantikörper an IE-Antigen und deren Detektion durch Sekundärantikörper. Während bei der immunzytochemischen Kernfärbung ein Indocarbocyanin-Konjugat als Sekundärantikörper verwendet wurde, kam beim ELISA ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper zum Einsatz. Als Substrat wurde o-Phenylendiamin hinzugegeben, welches nach Umwandlung durch die Peroxidase einen gelben Farbstoff bildet. Zur Quantifizierung und Auswertung

wurde die Extinktion gemessen. Das Verhältnis von Extinktion bei maximaler Infektion zur Extinktion der Negativkontrolle ist ein wichtiger Parameter für die Auswertung und Beurteilung des ELISA. Je größer die Differenz zwischen beiden Werten ist, umso genauer kann die Neutralisationskapazität der Proben bestimmt werden. Um ein möglichst gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis zu erhalten, wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten bestimmt.

#### *Antikörperkonzentration*

Für den Primärantikörper E13 wurde bereits von Mangin 2004 gezeigt, dass die Konzentration kaum Auswirkungen auf die Extinktion hat. Hingegen zeigte die Konzentration des Sekundärantikörpers deutliche Auswirkungen. Für den Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper wurde entsprechend dem Protokoll von Mangin die Konzentration von 1:1000 gewählt. Damit lag eine deutliche Differenz von maximalem Signal und Hintergrund als auch eine gute Ausnutzung des Messbereichs vor.

#### *Inkubationszeit*

Inkubationszeiten von jeweils 1 h für Primär- und Sekundär-Antikörper mit anschließenden 3 Waschschritten erwiesen sich für aussagekräftige und reproduzierbare Messergebnisse als optimal.

Nach Berechnung der relativen Neutralisationskapazität jeder Verdünnungsstufe erfolgte die graphische Darstellung in einem Kurvendiagramm, indem die relative Neutralisationskapazität gegen die Serumverdünnungsstufen aufgetragen wurde. Um die Neutralisationskapazität der einzelnen Seren quantifizieren und vergleichen zu können, wurde der 50 %-Neutralisationstiter aus der Graphik ermittelt und als NT-Titer für jedes Serum angegeben. Der 50 %-Neutralisationstiter bezeichnet diejenige Serumverdünnung, bei der 50 % der Zellkulturen durch das Serum geschützt sind.

## Ablauf des ELISA-basierten Mikroneutralisationstests

### 1. Probenvorbereitung und Infektion der Zellen

**Aussaat der Zellen auf 96- Well- Mikrotiterplatten**



nach Zellart  
16h bzw. 48h Inkubation,  
37°C/ CO<sub>2</sub>- Inkubator

**Herstellen von Serumverdünnungen 1:50 – 1:6400**  
mit konstanten Mengen an titriertem infektiösem HCMV  
(MOI 10), Postivkontrolle u. Negativkontrolle  
3-fach-Ansätze



4h Inkubation der Ansätze,  
37°C/ CO<sub>2</sub>- Inkubator

**1x waschen, dann Zugabe der Neutralisationsansätze  
zu den Zellen**



nach Zellart 16h bzw. 48h  
Inkubation,  
37°C/ CO<sub>2</sub>- Inkubator

**Fixierung**  
5% GAA (glacial acetic acid)



10 min bei Raumtemperatur

**3 x Waschen der Zellen**



**Permeabilisierung**  
Triton-X-100 (0,01%)



10 min bei Raumtemperatur

**3 x Waschen der Zellen**

Abbildung 8: Darstellung des Ablaufs des ELISA-basierten Mikroneutralisationstests (Teil 1)

## 2. ELISA

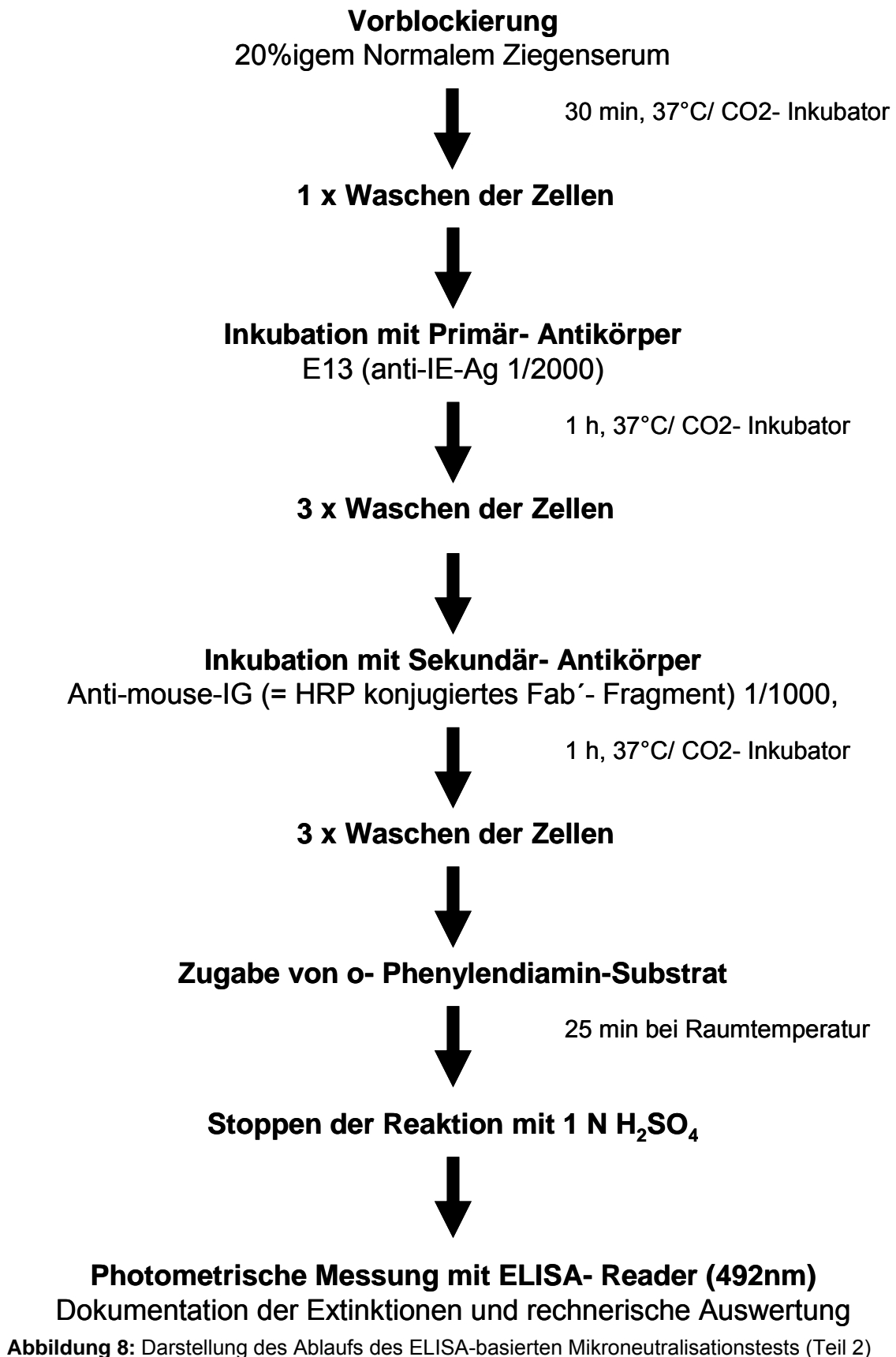
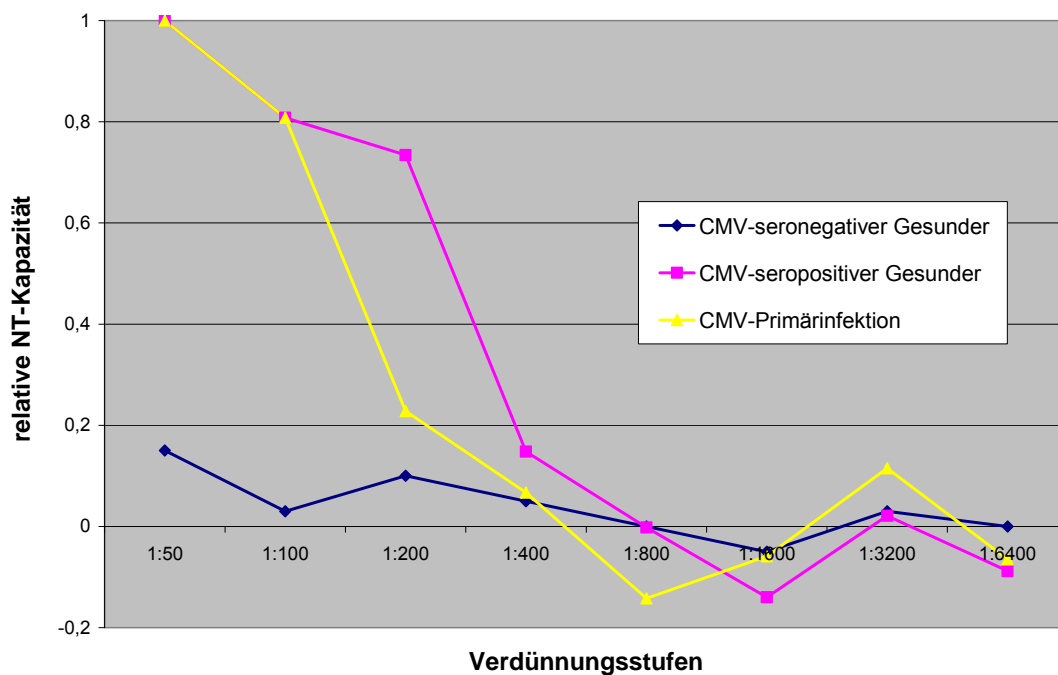


Abbildung 8: Darstellung des Ablaufs des ELISA-basierten Mikroneutralisationstests (Teil 2)

### 3.2.3 NT-Testung von Seren mit unterschiedlichem HCMV-Status unter Verwendung der verschiedenen Zelllinien

Für die Etablierung der Testmethode wurden Seren von HCMV-positiven und HCMV-negativen Erwachsenen verwendet. Dabei wurden als Zielzellen für die Infektion sowohl HFF als auch die 3 plazentaren Zelltypen getestet. Wie zu erwarten war, zeigten HCMV-negative Seren keinen Neutralisationseffekt, während sich bei seropositiven Proben eine Dosis-Wirkungskurve ergab, die sich mit zunehmender Verdünnung Null annäherte. Dies konnte für alle 4 verwendeten Zelllinien gezeigt werden. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Testung von Seren eines HCMV-IgG-negativen, eines HCMV-IgG-positiven Spenders sowie einer HCMV-primärinfizierten Schwangeren auf Trophoblasten (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Testung des Neutralisationseffektes von Spenderseren mit unterschiedlichem HCMV-Serostatus (HCMV-IgG-negativ, HCMV-IgG-positiv, HCMV-Primärinfektion) auf primären Trophoblasten.

### **3.2.4 Vergleich der herkömmlich gemessenen NT-Titer und Messung der Neutralisationskapazität im ELISA**

Im Rahmen der Schwangerschafts-Diagnostik waren die NT-Titer der Serumproben mit immunzytochemischer Färbung und lichtmikroskopischer Auswertung bestimmt worden (Labor Enders/Stuttgart). Dabei wurden im Mikroneutralisationstest Serumverdünnungen von 1:4 – 1:1024 standardmäßig auf embryonalen Lungenfibroblasten (ELU) untersucht. Für den ELISA-basierten Test wurde eine Verdünnungsreihe von 1:50 – 1:6400 gewählt, zum einen um die benötigten Serummengen möglichst gering zu halten, und zum anderen wegen der in Vorversuchen auffälligen deutlich höheren NT-Titer für die plazentaren Zelltypen, die entsprechend höhere Serumverdünnungen notwendig machten.

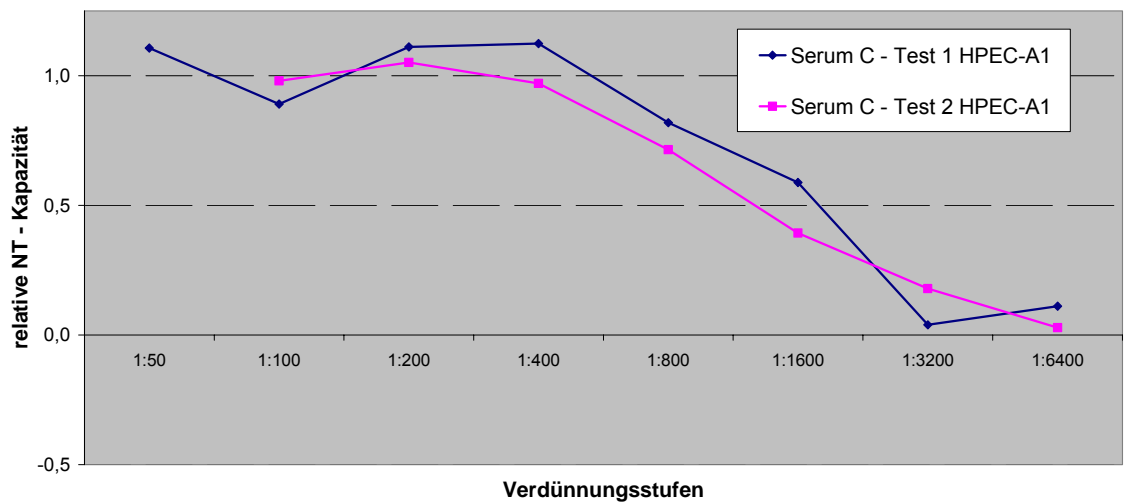
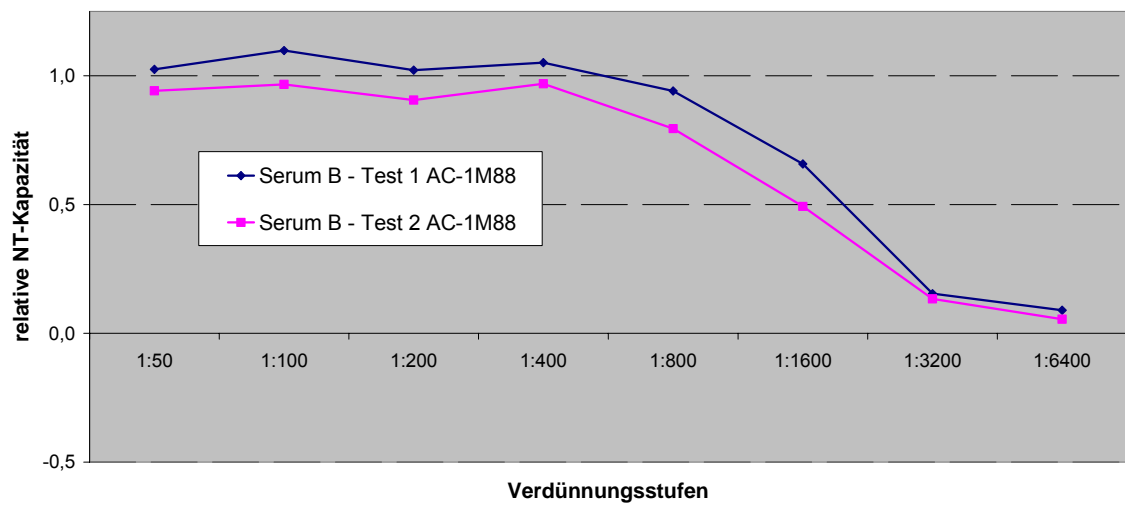
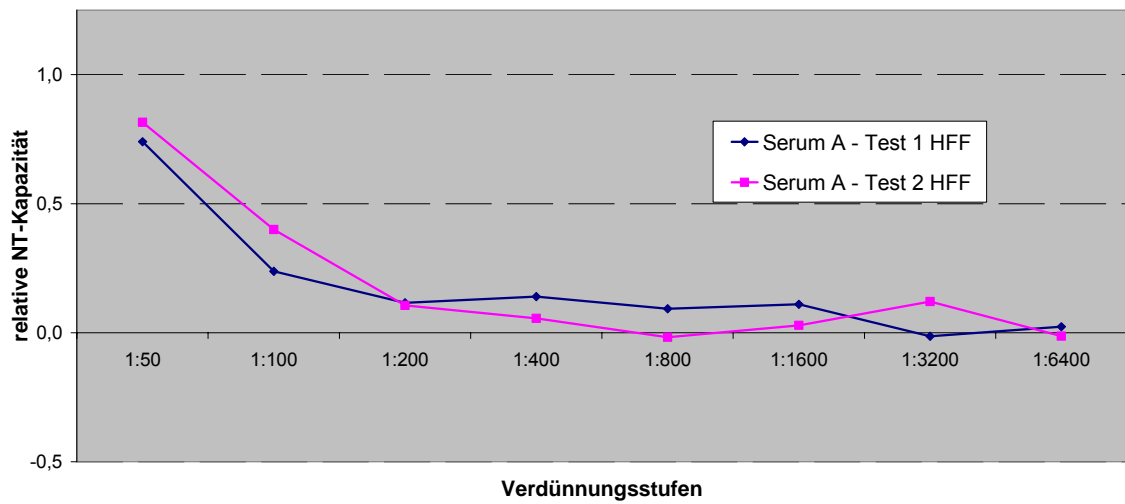
Ein Vergleich der NT-Titer, die mit den verschiedenen Methoden bestimmt wurden, war aufgrund der unterschiedlichen Serum-Verdünnungen nur eingeschränkt möglich. Die Werte beider Testverfahren lagen dennoch im vergleichbaren Bereich: Die im ELISA-Mikroneutralisationstest auf HFF ermittelten NT-Titer aller Serumproben lagen im Bereich von <1:50 bis 1:100. Die Titer des herkömmlichen NT-Tests reichten von <1:4 bis 1:128 bei Testung auf embryonalen Lungenfibroblasten. Zusätzlich zeigten sich bei vergleichbaren Verdünnungsstufen annähernde Übereinstimmungen (Tabelle 2). Bei Verlaufs-Seren einer Schwangerschaft, die bei herkömmlicher Titerbestimmung einen deutlichen Titer-Anstieg oder eine NT-Serokonversion zeigten, konnte dies auch mit dem ELISA nachgewiesen werden. Die ELISA-basierte Methode scheint also ebenfalls zur NT-Titer-Bestimmung geeignet.

| Mutter / SS | Serum-Nr. | NT ELU | NT-ELISA HFF |
|-------------|-----------|--------|--------------|
| 1.3         | 1.3.1     | <1:4   | <1:50        |
| 1.4         | 1.4       | 1:128  | n.d.         |
| 1.5         | 1.5.1     | 1:8    | <1:50        |
|             | 1.5.2     | 1:64   | n.d.         |
| 1.6         | 1.6.1     | <1:4   | <1:50        |
|             | 1.6.2     | 1:16   | <1:50        |
| 1.8         | 1.8.1     | <1:4   | <1:50        |
|             | 1.8.4     | 1:128  | 1:100        |
| 2.1         | 2.1.1     | <1:4   | <1:50        |
|             | 2.1.2     | 1:4    | <1:50        |
| 2.4         | 2.4.1     | <1:4   | <1:50        |
|             | 2.4.2     | 1:32   | 1:50         |
| 2.5         | 2.5       | 1:128  | 1:100        |
| 3.1         | 3.1.1     | 1:8    | <1:50        |
|             | 3.1.3     | 1:128  | 1:100        |

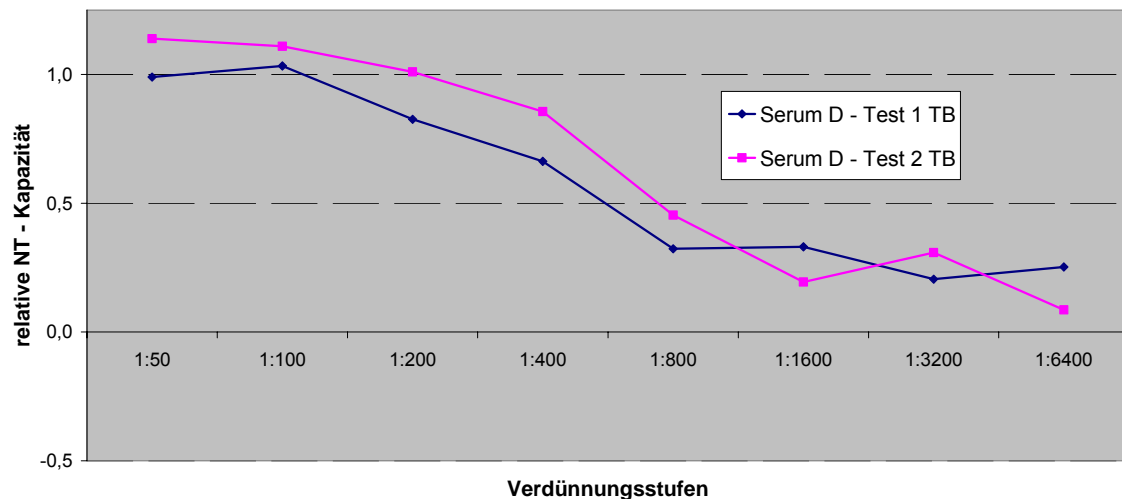
**Tabelle 2:** Herkömmlich ermittelte NT-Titer und Bestimmung der NT-Titer durch ELISA im Vergleich.

### **3.2.5 Reproduzierbarkeit des Mikroneutralisationstests**

Um die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu überprüfen, wurden bei allen 4 Zelltypen wiederholte, unabhängige Testungen von Serumproben durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Verwendet wurden Serumproben primärinfizierter Schwangerer. Die NT-Titer der unabhängigen Testungen eines Serums stimmten für den jeweiligen Zelltyp überein oder unterschieden sich um weniger als eine Titer-Stufe (Abb. 10). Für den ELISA-basierten Mikroneutralisationstest konnte somit eine minimale Intertest-Variabilität festgestellt werden. Die Methode kann daher verlässlich für die Bestimmung der NT-Kapazität von HCMV-Antiseren eingesetzt werden.







**Abbildung 10:** Reproduzierbarkeit des MNTA. Für alle 4 verwendeten Zelltypen wurden in unabhängigen Testungen die NT-Profile jeweils eines HCMV-Antiserums ermittelt und verglichen. Die verwendeten Seren stammten von HCMV-primärinfizierten Schwangeren. Die Graphiken zeigen die unabhängigen Testungen mit HFF (A), AC-1M88 (B), HPEC-A1 (C) und primären Trophoblasten (D).

### **3.3 Untersuchung des Neutralisationseffektes von Seren primärinfizierter Schwangerer auf die HCMV-Infektion von plazentaren Zellen und HFF**

15 Seren aus 9 Schwangerschaften mit gesicherter HCMV-Primärinfektion wurden im Mikroneutralisationstest hinsichtlich ihres Neutralisationseffektes auf die HCMV-Infektion von Trophoblasten-Primärkulturen, einer plazentaren Endothelzelllinie (HPEC-A1), einer den extravillösen Trophoblasten-verwandten Zelllinie (AC-1M88) und HFF als Standard-Zelltyp untersucht. Dabei war insbesondere die Testung der villösen Trophoblasten, die in vivo die erste Barriere für die maternofetale Transmission von HCMV darstellen, von Interesse.

Wird der Neutralisationseffekt der Serumproben primärinfizierter Schwangerer auf plazentaren Zelltypen untersucht, zeigen sich im Vergleich zu HFF signifikant höhere NT-Titer. Das heißt, Neutralisation findet hier bei wesentlich höheren Serumverdünnungen statt. Bei den Trophoblasten wurden für die Serumproben NT-Titer zwischen 1:200 und 1:1600 gemessen. Bei den Zelllinien HPEC-A1 und AC-1M88 lagen die Titer im vergleichbaren Bereich:

Bei AC-1M88 ergaben sich NT-Titer zwischen 1:200 und 1:1600, bei HPEC-A1 zwischen 1:100 bis 1:1600. Wurden die mit den 3 plazentaren Zelllinien ermittelten NT-Titer für die einzelnen Seren miteinander verglichen, konnten in den überwiegenden Fällen für die einzelnen Seren geringe Unterschiede um meist eine Titerstufe festgestellt werden, in einigen Fällen variierten die NT-Titer jedoch deutlich (Tabelle 3).

Bei den Verlaufsseren jeweils einer Schwangerschaft waren bei der Testung mit HFF ein NT-Titer-Anstieg bzw. eine NT-Serokonversion nachgewiesen worden. Dies ist ein geeignetes diagnostisches Kriterium zur Differenzierung zwischen akuter und älterer HCMV-Infektion (Eggers et al. 1998). Bei den 2 Schwangerschaften (Tabelle 3: SS 1.8 und SS 3.1) mit je 2 Verlaufsseren und deutlichem Titeranstieg bei der Testung mit HFF konnte dies bei den plazentaren Zelllinien nur in einem Fall beobachtet werden.

| Mutter/SS | Serum-Nr. | NT-Titer HFF | NT-Titer TB | NT-Titer HPEC-A1 | NT-Titer AC-1M88 | kongen. Infektion |
|-----------|-----------|--------------|-------------|------------------|------------------|-------------------|
| 1.3       | 1.3.1     | <1:50        | 1:400       | 1:800            | 1:400            | ja                |
| 1.4       | 1.4       | n.d.         | 1:1600      | 1:200            | 1:800            | ja                |
| 1.5       | 1.5.1     | <1:50        | 1:800       | 1:1600           | n.d.             | ja                |
|           | 1.5.2     | n.d.         | n.d.        | 1:200            | 1:400            |                   |
| 1.6       | 1.6.1     | <1:50        | 1:200       | 1:100            | 1:800            | nein              |
|           | 1.6.2     | <1:50        | 1:200       | 1:400            | 1:800            |                   |
| 1.8       | 1.8.1     | <1:50        | n.d.        | 1:400            | 1:400            | nein              |
|           | 1.8.4     | 1:100        | 1:400       | 1:1600           | 1:1600           |                   |
| 2.1       | 2.1.1     | <1:50        | 1:400       | 1:800            | 1:800            | nein              |
|           | 2.1.2     | <1:50        | 1:200       | 1:400            | 1:800            |                   |
| 2.4       | 2.4.1     | <1:50        | 1:800       | 1:1600           | 1:400            | ja                |
|           | 2.4.2     | 1:50         | 1:800       | 1:1600           | n.d.             |                   |
| 2.5       | 2.5       | 1:100        | 1:1600      | 1:1600           | 1:1600           | ja                |
| 3.1       | 3.1.1     | <1:50        | 1:200       | 1:400            | 1:200            | nein              |
|           | 3.1.3     | 1:100        | 1:200       | 1:400            | 1:200            |                   |

**Tabelle 3:** NT-Titer primärinfizierter Schwangerer bei Testung mit HFF, primären Trophoblasten, HPEC-A1 und AC-1M88 mittels ELISA-Mikro-NT-Assay. Dargestellt ist dazu der Schwangerschaftsausgang im Hinblick auf eine kongenitale Infektion.

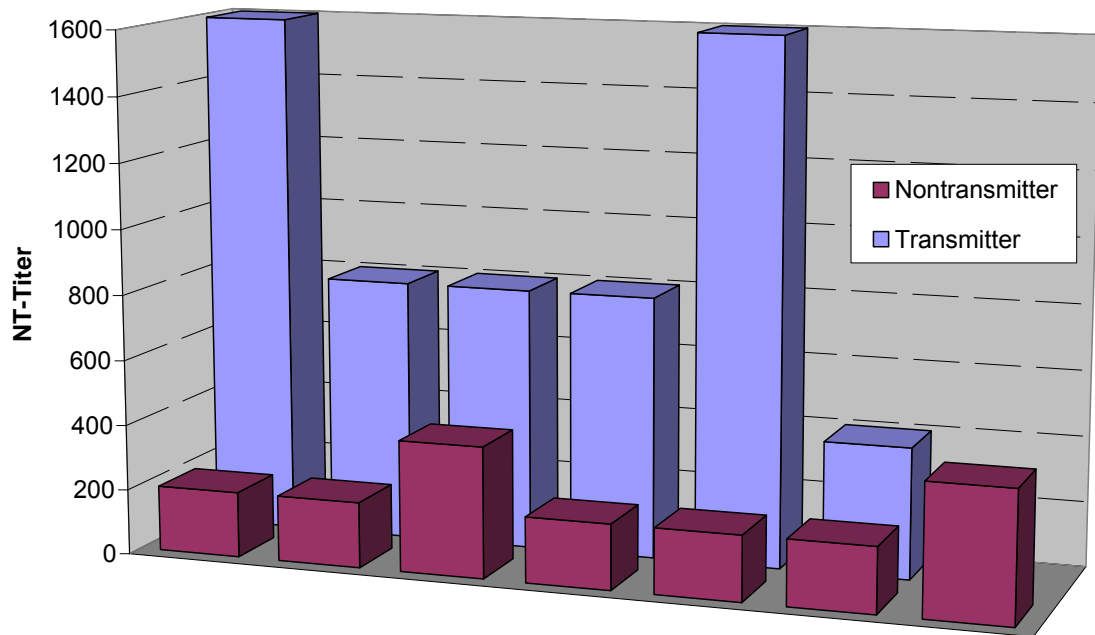
### **3.4 Vergleich der NT-Antikörperprofile von Transmittern und Non-Transmittern bei HCMV-Primärinfektion in der Schwangerschaft**

Bei 9 HCMV-primärinfizierten Schwangeren kam es in 5 Fällen (55,6%) zur vertikalen Übertragung der HCMV-Infektion. Ein zentrales Anliegen der Arbeit war es herauszufinden, ob die Untersuchung der Neutralisationskapazität von Seren primärinfizierter Schwangerer auf organtypischen Zellen im Gegensatz zur Standard-Testung auf HFF eine Aussage zur Abschätzung des Risikos einer maternofetalen Infektionsübertragung erlaubt. Hierzu wurden nach

Abschluss der Experimente die ermittelten NT-Antikörper-Profile von Transmittern und Nontransmittern verglichen.

Bei Betrachtung der Neutralisationskapazität von Transmitter- versus Nontransmitter-Seren zeigt die Testung mit Trophoblasten signifikante Unterschiede in der Titerhöhe. Bei den insgesamt 7 getesteten Seren der 4 Nontransmitter betrug der NT-Titer 1:200 bei 5 Seren und bei weiteren 2 Seren 1:400. Bei den 6 untersuchten Seren der 5 Transmitter lagen die NT-Titer bei einem Serum bei 1:400, bei 3 Seren bei 1:800 und bei 2 Seren bei 1:1600 (Abb. 11). Höhere Neutralisationstiter scheinen also eher mit einer maternofetalen Übertragung der HCMV-Primärinfektion einherzugehen ( $p=0,0476$  Fisher's Exact Test). Lediglich bei einem Serum aus der Transmittergruppe ergibt sich eine Überschneidung mit der Nontransmittergruppe bei einem NT-Titer von 1:400.

Bei HFF variieren die im ELISA ermittelten NT-Titer zwischen  $< 1:50$  bis 1:100; ein Zusammenhang von Titerhöhe und Transmission war nicht erkennbar. Auch die Testung mit der plazentaren Endothelzelllinie HPEC-A1 und der Trophoblasten-verwandten Zelllinie AC-1M88 ließen diesbezüglich keine Schlüsse zu. Zwar lagen die Titer im vergleichbaren Bereich wie bei der Testung auf primären Trophoblasten, jedoch variieren die NT-Titer in der Transmittergruppe sowie in der Nontransmittergruppe ohne erkennbare Korrelation von Titerhöhe und Transmission (Tabelle 3). Einzig bei Testung mit villösen Trophoblasten ließ sich aus der NT-Titer-Höhe ein prädiktiver Wert für die Transmission ableiten.



**Abbildung 11:** Untersuchung der Neutralisationskapazität von Seren HCMV-primärinfizierter Schwangerer auf Trophoblasten. Vergleich der NT-Titer von Transmittern und Nontransmittern.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Entwicklung eines Trophoblasten-Zellkulturmodells für HCMV-Infektionsstudien**

#### *Bedeutung der plazentaren HCMV-Infektion für die vertikale Transmission*

Als erste Barriere zwischen mütterlicher und kindlicher Zirkulation kommt den Synzytiotrophoblasten hinsichtlich der vertikalen Transmission eine entscheidende Rolle zu. Um sie zu durchdringen, sind im Wesentlichen drei Mechanismen vorstellbar: Das Virus oder infizierte Zellen könnten durch Lücken gelangen, die durch Schäden in der Zellschicht entstanden sind. Eine andere Möglichkeit ist die produktive Infektion von Synzytiotrophoblasten mit Ausbreitung auf das Zottenstroma und die fetalen Kapillaren. Vorstellbar ist außerdem der Transport von Immunglobulin-Virus-Komplexen im Sinne der Transzytose. Es konnte gezeigt werden, dass HCMV in der Lage ist, die Trophoblastenschicht produktiv zu infizieren (Hemmings et al. 1998, Halwachs-Baumann et al. 1998, Fisher et al. 2000, Gabrielli et al. 2001). Zudem gelang der Nachweis, dass HCMV von produktiv infizierten Trophoblasten auf Stromazellen und fetale Endothelzellen übertragen werden und so die kindliche Blutbahn erreichen kann (Nahmias et al. 1994, Gabrielli et al. 2001). Obwohl die exakte Rolle der HCMV-Infektion von villösen Trophoblasten für die intrauterine Übertragung noch nicht definiert ist, sind deren potentielle HCMV-Infektion und histologische Befunde wie Villitiden in Plazenten kongenital infizierter Neugeborener unumstritten und lassen keinen Zweifel zu an der zentralen Bedeutung dieser Zellen für eine intrauterine Übertragung. Um weitere Erkenntnisse über die HCMV-Infektion von Trophoblasten und die zur transplazentaren Übertragung führenden Mechanismen zu gewinnen, war es ein primäres Ziel dieser Arbeit, ein Trophoblasten-Zellkulturmodell zu etablieren, um in einem nächsten Schritt die Wirkung von HCMV-Antisera auf die Infektion von Trophoblasten untersuchen zu können.

#### **4.1.1 Methodenetablierung zur Isolierung und Kultivierung von Trophoblasten aus Term-Plazenten**

Verwendet wurden Term-Plazenten nach komplikationsloser spontaner Geburt oder elektiver Sectio, die von der Universitäts-Frauenklinik Tübingen mit Einverständnis der Mütter zur Verfügung gestellt wurden. Voraussetzung war eine gute Zusammenarbeit mit den Kollegen der Frauenklinik, damit die Plazenten unmittelbar nach der Geburt übernommen und mit der Verarbeitung des Gewebes begonnen werden konnte. Ein Vorteil von Term-Plazenten gegenüber „unreifen“ Plazenten ist die wesentlich bessere Verfügbarkeit. Von Nachteil ist die eventuell kürzere Überlebenszeit der aus reifen Plazenten isolierten Zellen.

##### *Enzymatische Digestion*

Alle gängigen Methoden zur Trophoblasten-Isolierung und -Kultivierung leiten sich von der 1960 von Thiede entwickelten Gewebe-Trypsinierungsmethode ab. Als Grundlage für die hier angewandte Methode für Zellpräparation und -kultivierung, Reinheitsprüfung und Differenzierungsnachweis diente das Protokoll von Douglas und King (1989), welche wiederum die 1986 von Kliman etablierte Methode modifizierten bzw. weiterentwickelten.

Zahlreiche proteolytische Enzyme wie z. B. Hyaluronidase, Kollagenase oder Pronase wurden in der Vergangenheit zur enzymatischen Digestion von plazentarem Gewebe eingesetzt. Dabei konnten keine Vorteile gegenüber Trypsin festgestellt werden und die Ergebnisse erschienen im Hinblick auf die Kultivierung und Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten schlechter als bei der Verwendung von Trypsin. Erfolgreich und eventuell zuverlässiger als Trypsin zeigte sich jedoch die Verwendung von Dispase (Yeger et al. 1989, Karl et al. 1992, Eis et al. 1995) und Protease XV (Bax et al. 1989, Bullen et al. 1990, Richards et al. 1994). DNase wurde bereits von Hall et al. 1977 und Stromberg et al. 1978 hinzugefügt, um störende Einflüsse von ausfallender DNA auf die Zellisolierung zu vermeiden. Für diese Arbeit wurde der Verdau mit einer kombinierten Enzymlösung aus Trypsin, Dispase und DNase durchgeführt. Die Verwendung von Dispase entspricht einer Modifikation des Protokolls von

Douglas und King. Die Digestion wurde, in Übereinstimmung mit Douglas und King, zweimal wiederholt. Ergebnisse von Karl, Alpy und Fisher (1992) haben bezüglich des Zellertrags und der Enzymwirksamkeit einen Vorteil der seriellen Digestion mit einer kombinierten Enzymlösung aus Trypsin, Dispase und Collagenase gegenüber einer einmaligen Digestion mit Trypsin oder Dispase gezeigt. Durch die Isolierungsmethode sollte eine hohe Reinheit gewährleistet sein, da auch eine geringfügige Verunreinigung durch Fibroblasten durch deren im Verhältnis zu Trophoblasten höheren Proliferationsrate zu einem Überwachsen der Primärkulturen führen kann. Bei der enzymatischen Digestion sollten die Bedingungen so mild wie möglich und die Gesamtzeit so kurz wie möglich gehalten werden, damit möglichst wenige der unter der Trophoblastenbasalmembran liegenden Zellen in die Zellsuspension gelangen.

#### *Trophoblasten-Selektionierung*

Die Dichtegradienten-Zentrifugation mit Ficoll oder Percoll wurde erstmals von Stromberg et al. (1978) und von Zeitler et al. (1983) angewendet. Kliman et al. (1986) konnten durch Verwendung eines diskontinuierlichen Percoll-Gradienten bei einer Dichte von 1,048-1,062 g/ml 95 % vitale Zellen gewinnen und mittels immunzytochemischer Färbung eine geringe Kontaminationsrate von 1 – 5 % Vimentin-positiver Zellen (mesenchymale und endotheliale) und  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin-positiver Zellen (Makrophagen) nachweisen. Die Dichtegradienten-Zentrifugation wird von vielen Forschungsgruppen angewendet und hat sich als verlässliche Methode erwiesen. In Übereinstimmung mit Protokollen anderer Arbeitsgruppen (u. a. Douglas & King 1989, Nelson et al. 1990, Cervar et al. 1998) wurde für die vorliegende Arbeit ein kontinuierlicher Percoll-Gradient angewendet. Während Douglas und King nach Dichtegradienten-Zentrifugation einen Anteil Vimentin-positiver Zellen von 2 – 5 % fanden, war der Anteil kontaminierender Zellen bei Cervar et al. mit bis zu 30 % deutlich höher. Für die vorliegende Arbeit erfolgte die Reinheitsprüfung erst nach durchgeführter Immunopurifikation; der Anteil kontaminierender Zellen lag unter 5 % und ist somit vergleichbar mit dem Ergebnis von Cervar.



Die Selektionierung von Zellen durch immunologische Methoden basiert auf der Bindung geeigneter, gegen membranständige Antigene der Zielzellen gerichteter Antikörper und Separation der Antikörper-gebundenen Zellen. Für Trophoblasten wurde eine immunologische Separation erstmals von Contractor und Sooranna angewendet (1988). Mittels Trophoblasten-spezifischer monoklonaler Antikörper und mit Sekundärantikörper-beschichteten Zellkulturplatten wurden die Zielzellen im Sinne einer Positivselektion an die Platten gebunden, während nicht-gebundene Zellen ausgewaschen wurden. Damit konnte eine Anreicherung der Trophoblasten mit einem Anteil von ca. 63 % erzielt werden. Nachteilig für weitere Untersuchungen ist jedoch eine durch die Antikörperbindung verursachte Alteration mit möglicher Beeinflussung der Eigenschaften der Trophoblasten. Demgegenüber können mittels Negativselektion kontaminierende Zellen durch Bindung spezifischer Antikörper eliminiert werden. Im Gegensatz zu den Zellen des Zottenstromas haben villöse Trophoblasten die Eigenschaft keine HLA-Antigene zu exprimieren (Faulk & Temple 1976, Sunderland et al. 1981, Hsi et al. 1982, Bulmer & Johnson 1985). Extravillöse Trophoblasten exprimieren ein HLA-Klasse-Ib-Antigen, das HLA-G, was für die Selektion einer Population reiner villöser Trophoblasten von Vorteil ist.

Sehr gute Ergebnisse konnten mit der immunomagnetischen Separation erzielt werden. Douglas und King (1989) wendeten diese nach Anreicherung der Trophoblasten durch die Dichtegradienten-Zentrifugation an, um verbleibende kontaminierende Zellen zu entfernen. Hierbei wurden monoklonale Antikörper gegen MHC-Klasse-I- und II-Moleküle als Primärantikörper und an magnetische Mikrosphären gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Die gebundenen Zellen werden durch einen Magneten immobilisiert, sodass die reine Trophoblastensuspension asserviert werden kann. Douglas und King konnten durch die Kombination aus Dichtegradienten-Zentrifugation und immunomagnetischer Separation die Methode von Kliman et al. (1986) optimieren. Während der Anteil Vimentin-positiver Zellen bei Kliman et al. bei 5 – 10 % lag, konnten Douglas und King reine Kulturen villöser Trophoblasten, die frei von kontaminierenden Zellen waren, demonstrieren. Für die vorliegende

Arbeit wurden entsprechend Percoll-Gradient und immunomagnetische Separation kombiniert und damit eine Reinheit von > 95 % villöser Trophoblasten erzielt. Um die HLA-Klasse-I-Antigen exprimierenden Zellen von den villösen Trophoblasten zu trennen, wurde der gegen HLA-Klasse-I-Antigene (inklusive HLA-G) gerichtete monoklonale Antikörper W6/32 verwendet (Le Bouteiller et al. 1996). Cervar et al. (1998) verwendeten ebenfalls den Antikörper W6/32 und erzielten mit der Kombination aus Dichtegradienten-Zentrifugation und immunomagnetischer Separation vergleichbare Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurde als weiterer Reinigungsschritt eine Erythrozytenlyse durchgeführt, um in der Zellpräparation verbliebene Erythrozyten zu entfernen. Dies scheint jedoch bei der angewendeten Selektionsmethode auch im Hinblick auf Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die keine Erythrozytenlyse durchführten (Douglas und King 1989, Cervar et al. 1998), von untergeordneter Bedeutung zu sein

Als weiterer Ansatzpunkt, die Reinheit der Trophoblastenkulturen zu steigern, wurde in der Vergangenheit versucht, durch Kultivierung auf verschiedenen extrazellulären Matrices wie Polylysin, Gelatine (Morrish & Siy 1986), Kollagen (Morrish & Siy 1986, Truman & Ford, 1986, Yeger et al. 1989) und Fibronectin (Morrish & Siy 1986, Daniels-McQueen et al. 1987) eine möglichst selektive Anreicherung von Trophoblasten zu erreichen, jedoch ohne sicheren Erfolg. Bei der Methodenetablierung für die vorliegende Arbeit konnten durch Beschichtungen der Kulturplatten mit Gelatine, Laminin und Kollagenen ebenfalls keine Vorteile für die Reinheit, das Gedeihen, die Differenzierung oder die Adhäsion der Zellen festgestellt werden, sodass auf Beschichtungen verzichtet wurde.

#### *Reinheitsprüfung und Überwachung*

Für die Reinheitsprüfung und Überwachung der Primärkulturen hat sich die Färbung mittels monoklonaler Antikörper gegen Vimentin und Zytokeratin 7 als geeignet erwiesen (Blaschitz et al. 2001) und wurde für die Beurteilung der Reinheit der hier gewonnenen Trophoblastenkulturen angewendet. Das Intermediärfilament Vimentin wird von Zellen mesenchymaler Herkunft

exprimiert (Weber & Osborn 1982, Khong et al. 1986) und lässt sich in allen villösen Stromazellen nachweisen (Nakamura & Ohta 1990). Mit Anti-Vimentin werden daher alle Zottenstromazellen und Leukozyten gefärbt, während Trophoblasten kein Vimentin exprimieren. Zur Färbung der Trophoblasten als Zellen epithelialer Natur eignen sich Zytokeratine (Daya & Sabet 1991), wobei gezeigt wurde, dass einige dieser Intermediärfilamente auch im Zottenstroma nachweisbar sind (Blaschitz et al. 1997). Bei der Untersuchung der Expression verschiedener Keratin-Typen im Plazentagewebe konnte Anti-Zytokeratin 7 als hochspezifischer Trophoblastenmarker, der quasi ausschließlich Trophoblasten färbt, identifiziert werden (Blaschitz et al. 2001). Die Beobachtung, dass Zytokeratin 7 auch in endometrialen Drüsen exprimiert wird, ist nicht von praktischer Relevanz für die Isolierungsmethode, da bereits als Ausgangsmaterial selektiv villöses Gewebe verwendet wird.

#### *Bedingungen und Kriterien für die Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten*

Damit eine Differenzierung von Zytotrophoblasten zu Synzytiotrophoblasten stattfindet, bedarf es optimaler Bedingungen sowohl bei der Zellpräparation als auch bei deren Kultivierung. Es ist davon auszugehen, dass die Auswahl der proteolytischen Enzyme zur Gewebedigestion insofern Auswirkungen auf die Differenzierung hat, als dass nach Verwendung anderer Enzyme als Trypsin, Protease XV oder Dispase keine Synzytialisierung bewiesen wurde. Des Weiteren ist eine adäquate Zelldichte zur Ausbildung von Synzytien notwendig. Eine Kontamination mit anderen Zelltypen kann der Differenzierung entgegenstehen (Bloxam et al. 1997, Cervar et al. 1998). Auch wenn villöse Trophoblasten hoher Reinheit isoliert werden, scheint das Ausmaß der Differenzierung in hohem Maße von den Kulturbedingungen abzuhängen (Kao et al. 1988, Kliman & Feinberg 1990, Loke 1990, Coutifaris et al. 1991). Beispielsweise ist zur Formation von Synzytien die Aggregation der Zytotrophoblasten nötig, was wiederum voraussetzt, dass die Zellen auf der Kulturoberfläche beweglich sind. Auf Glas und Plastikoberflächen ist hierzu ein im Kulturmedium enthaltener Anteil von Serum nötig. Man nimmt an, dass dies Motilitätsfaktoren liefert (Kao et al. 1988, Babalola et al. 1990). Unter Verwendung von serumfreiem Medium kann durch Beschichtung der

Kulturoberfläche mit verschiedenen extrazellulären Matrices wie Fibronectin, Kollagen Typ I oder IV Zellbeweglichkeit ermöglicht werden (Daniels-McQueen et al. 1987, Kao et al. 1988). Im Vergleich dazu bewirkt die Zugabe von Serum jedoch einen stärkeren Effekt (Kao et al. 1988).

Der Auswahl des Kulturmediums wurde in früheren Arbeiten eine untergeordnete Rolle zugeschrieben; so fand die Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten bei der Verwendung verschiedener Kulturmedien wie z. B. DMEM, RPMI-1640, MEM oder Keratinozyten-Wachstums Medium statt (Bloxam et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit zeigte jedoch die Kultivierung mit serumfreiem Keratinozyten-Medium (KSFM) und Zusatz von 20 % fetalem Kälberserum gegenüber anderen Zusammensetzungen überlegene Ergebnisse für das Gedeihen und die Synzytialisierung der Zellen. Auch andere Autoren stellten Einfüsse unterschiedlicher Kulturmedien fest. Es gibt Berichte über eine ausgeprägtere Differenzierung bei Verwendung von Keratinozyten-Wachstumsmedium gegenüber Ham's F12 oder DMEM (Douglas & King 1990, Hahn et al. 1998) oder Vorteilen von DMEM gegenüber Medium 199 (Lobo et al. 1987).

Einen Einfluss auf die Differenzierung in Synzytiotrophoblasten hat auch das Gestationsalter der verwendeten Plazenten. Zwar konnten Synzytien auch in Trophoblasten-Kulturen aus ersttrimestrigen Plazenten nachgewiesen werden (Cotte et al. 1980, Daniels-McQueen et al. 1987, Kliman & Feinberg 1990), allerdings konnte eine ausgedehnte Synzytialisierung nur bei der Kultivierung von Zytotrophoblasten aus Term-Plazenten verifiziert werden. Das Differenzierungsverhalten von Zellen aus Plazenten jüngeren Gestationsalters scheint sich von dem der Zellen aus reifen Plazenten zu unterscheiden. So wird für Zytotrophoblasten aus ersttrimestrigen Plazenten eine stärkere Proliferationstendenz beschrieben (Truman & Ford 1986, Vettenranta et al. 1986, Yeger et al. 1989). Es wurde zudem beobachtet, dass diese Zellen extrazelluläre Matrix angreifen (Fisher et al. 1989). Folglich scheinen diese Zytotrophoblasten mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einem invasiven Phänotyp zu differenzieren (Loke & Burland 1988, Loke et al. 1989), sodass möglicherweise andere Isolierungs- und Kulturbedingungen als bei

Zytotrophoblasten aus Term-Plazenten nötig sind, um eine Differenzierung in Synzytiotrophoblasten zu induzieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte die für villöse Trophoblasten typische morphologische Differenzierung mit Ausbildung von mehrkernigen Synzytien durch Zellfusion ab dem 3. Tag in Kultur festgestellt werden, was sich mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen deckt (Yui et al. 1994, Clarson et al. 1996, Cervar et al. 1998).

Jedoch umfasst die Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten außer der morphologischen Differenzierung auch bestimmte biochemische Veränderungen wie z. B. die Entwicklung der Fähigkeit hCG und hPL zu synthetisieren und zu sezernieren (Feinman et al. 1986, Kao et al. 1988, Bax et al. 1989, Douglas & King 1990). Trophoblasten, die die Fähigkeit zur Sekretion spezifischer Hormone besitzen, jedoch keine morphologische Differenzierung aufweisen, konnten wiederholt demonstriert werden (Truman & Ford 1986, Yeger et al. 1989, Schmon et al. 1991). Ebenso kann durch EGF oder zyklisches AMP die Hormonsekretion sowie weitere biochemische Differenzierungsvorgänge gefördert werden, ohne dass sich ein Einfluss auf die Synzytialisierung ergibt (Kao et al. 1988, Douglas & King 1990, Coutifaris et al. 1991).

Um die Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten in Kultur zu verifizieren, können zur morphologischen Beurteilung Licht- und Elektronenmikroskopie eingesetzt werden; zudem lässt sich anhand immunzytochemischer Färbung für Desmoplakin, dessen Gehalt in der Kultur mit zunehmender Ausbildung von Synzytien abnimmt, die Differenzierung indirekt sichtbar machen. Zur funktionellen Beurteilung können z. B. die Synthese von Hormonen wie hCG und hPL oder die Expression bestimmter Proteine und Polypeptide wie plazentare alkalische Phosphatase, schwangerschaftsspezifisches  $\beta$ 1-Glykoprotein, Inhibin oder Aktivin durch immunzytochemische Färbung visualisiert werden. Für die vorliegende Arbeit konnte die Differenzierung neben der lichtmikroskopischen Darstellung durch Demonstration des Gehalts von hCG und Desmoplakin mittels immunzytochemischer Färbung gezeigt werden:

Lichtmikroskopisch waren ab Tag 3 Synzytien nachweisbar, gleichzeitig stieg der Gehalt an hCG deutlich an, während der Gehalt an Desmoplakin abnahm. Die Untersuchung dieser Kriterien erscheint gut zur Beurteilung der Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten geeignet, da sowohl morphologische als auch funktionelle Kriterien erfasst werden.

Vergleicht man die in Kultur stattfindende Differenzierung sowohl morphologisch als auch funktionell mit Synzytiotrophoblasten in vivo, kann eine enge Übereinstimmung festgestellt werden. Das in vitro-Modell erscheint somit durchaus für weitere Untersuchungen zur Funktion von Synzytiotrophoblasten geeignet zu sein (Bloxam et al. 1997).

Die für diese Arbeit entwickelte Methode zur Trophoblastenisolierung und -kultivierung erfüllt neben einer hohen Reinheit der Primärkulturen Kriterien der morphologischen und funktionellen Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Trophoblasten unmittelbar nach Isolierung und Reinigung eingefroren werden können und eine Kultivierung mit einem nur geringen Verlust vitaler Zellen ebenso wie mit frischen Zellen erfolgreich möglich ist. Dies ist aufgrund der dadurch flexibler und komfortabler planbaren weiteren Experimente von großem Vorteil.

#### **4.1.2 Permissive HCMV-Infektion von Trophoblasten-Primärkulturen**

Dass Trophoblasten produktiv mit HCMV infizierbar sind, konnte in den letzten Jahren von verschiedenen Forschungsgruppen demonstriert werden. Sowohl anhand isolierter villöser Trophoblasten (Hemmings et al. 1998, Halwachs-Baumann et al. 1998, Fisher et al. 2000) als auch an intakten Plazenta-Gewebeteilen (Gabrielli et al. 2001) wurde gezeigt, dass der HCMV-Replikationszyklus vollständig abläuft, jedoch mit einer gegenüber Fibroblasten verzögerten Antigenkinetik. Unter den hier geschaffenen Bedingungen und insbesondere im Hinblick auf die zeitliche Planung der Experimente zur Messung der Neutralisationskapazität von HCMV-Antisera wurde die HCMV-Infektion der Trophoblasten-Primärkulturen untersucht. Als Hauptvoraussetzungen für die Untersuchung waren eine ausreichend lange

Lebensdauer der Primärkulturen von ca. 10 Tagen und eine geringe Fibroblasten-Kontamination gegeben.

Zur Infektion wurde das Endothelzell-propagierte HCMV-Isolat VHL-E verwendet. Bezüglich der Infektionseffizienz unterschiedlicher Virusstämme wurden in früheren Untersuchungen diskrepante Beobachtungen gemacht. Während Halwachs-Baumann et al. (1998) keine relevanten Unterschiede der Suszeptibilität von Trophoblasten für die Infektion mit verschiedenen klinischen Virusisolaten und den Laborstämmen AD 169 und Towne fanden, konnten Hemmings et al. (1998) für die Laborstämme AD 169 und Towne eine höhere Effizienz gegenüber dem Laborstamm Davis und einem klinischen Isolat feststellen. In einer anderen Studie erwies sich ein klinisches Isolat überlegen gegenüber AD 169 (Hemmings & Guilbert 2002). Insgesamt gelang die produktive Infektion von Trophoblasten bei allen Untersuchern mit jedem verwendeten Virusstamm, sodass die Auswahl des Virusstammes keine entscheidende Rolle spielt. Bei der vorliegenden Arbeit wurde dennoch wegen der evtl. größeren Wildtyp-Ähnlichkeit ein Patientenisolat den Laborstämmen vorgezogen.

Übereinstimmend mit den früher publizierten Daten gelang hier der Nachweis der produktiven HCMV-Infektion durch immunzytochemische Färbung für IE-, E- und L-Antigene sowie durch Transfer von Überständen infizierter Trophoblastenkulturen auf Fibroblastenkulturen mit daraus resultierender Infektion der Fibroblasten. Erwartungsgemäß zeigte sich eine langsame Antigenkinetik mit Nachweis von IE-Antigenen ab ca. 1 Tag p.i., E-Antigenen ca. 2 Tage p.i. und L-Antigene ca. 4 Tage p.i. bei Infektion mit einer MOI von 1. Eine vergleichbare Zeitkinetik bzw. Dauer des HCMV-Replikationszyklus in Trophoblasten beobachteten Halwachs-Baumann et al. (1998) und Fisher et al. (2000), während andere Autoren über erst deutlich späteren Nachweis der HCMV-Antigene berichten (Hemmings et al. 1998, Gabrielli et al. 2001). Da HCMV in proliferierenden Zellen rascher repliziert als in nicht-proliferierenden Zellen (Stinsky 1977) und Trophoblasten in vitro nicht proliferieren (Aplin 1991, Garcia-Lloret et al. 1996), ist die langsamere Replikation in Trophoblasten gegenüber Fibroblasten nicht überraschend. Für die Infektion von

Trophoblasten sind im Vergleich zu Fibroblasten deutlich höhere Viruskonzentrationen erforderlich (Hemmings et al. 1998). Durch Steigerung der MOI auf 10 konnte in der vorliegenden Arbeit eine Verbesserung der Infektionseffizienz mit Beschleunigung der Antigenkinetik erreicht werden, sodass 25 h p.i. bereits 95 % der Zellen IE-Antigen positiv waren. Dies war für die vorgesehenen Neutralisationstests von entscheidendem Vorteil, da für die Messung der Neutralisationskapazität eine effiziente Infektion der Trophoblasten gewährleistet sein und Einflüsse durch Qualitätsverluste bzw. Alterung der Kulturen mit Verlust vitaler Zellen vermieden werden sollten. Mit 48 h p.i. konnte so ein relativ früher Zeitpunkt für die Messung gewählt werden. Die beobachtete Steigerung der Infektionseffizienz durch höhere Viruskonzentrationen deckt sich mit früheren Untersuchungen (Chan et al. 2002). Andererseits sind auch Experimente beschrieben, bei denen eine Steigerung der MOI keinen Erfolg brachte, woraus geschlossen wurde, dass Trophoblasten teilweise resistent für die Infektion sind (Hemmings et al. 1998). Die in der vorliegenden Arbeit durch hohe Viruskonzentration erzielte ausgedehnte IE-Antigen-Positivität spricht aber gegen diese Theorie.

Diese Arbeit zeigte im Spätstadium der Infektion eine Schwellung und Auflösung des Zellverbandes insbesondere an Stellen mit extensiver Anhäufung von Virusproteinen, sodass eine lytische Wirkung der HCMV-Infektion angenommen werden kann. Allerdings konnte auch in nicht-infizierten Kontrollkulturen eine Degeneration der Synzytien festgestellt werden, wenn auch von geringerem Ausmaß. Eine Kombination aus HCMV-vermittelter Wirkung und Zellalterung ist daher wahrscheinlich. Lytische Wirkungen der HCMV-Infektion von villösen Trophoblasten wurden angesichts des Nachweises typischer zytopathischer Effekte und Zelllyse auch von anderen Untersuchern beschrieben (Halwachs-Baumann et al. 1998). Hingegen konnten bei quantitativen Vergleichen des DNA-Gehalts infizierter und nicht-infizierter Trophoblasten-Kulturen mit der Zeit in Kultur kein gesteigerter DNA-Verlust bei infizierten Kulturen festgestellt werden, obwohl charakteristische zytopathische Effekte ebenfalls beobachtet wurden (Hemmings et al. 1998). Dies würde gegen einen HCMV-vermittelten Zelluntergang sprechen, allerdings muss



angemerkt werden, dass die Effizienz der Infektion mit einem maximalen Anteil IE-positiver Kerne von 15 % bei der vorgenannten Studie gering war und der fehlende Effekt auf den DNA-Verlust evtl. dadurch erklärbar ist. Es gibt Erkenntnisse, dass die HCMV-Infektion von villösen Trophoblasten in vitro über eine IE-Gen-induzierte Sekretion von TNF $\alpha$  zur parakrinen vorzeitigen Apoptose von nicht-infizierten Nachbarzellen führt, während die Apoptose infizierter Zellen inhibiert wird (Chan et al. 2002). Bereits im frühen Stadium der Infektion, d. h. nach 24 h, zeigten Chan et al. einen relevanten Zellverlust, sodass Virusfreisetzung und Zytolyse als Ursache dafür nicht in Frage käme. Durch den Wachstumsfaktor EGF wird dieser HCMV-vermittelte, Apoptosebedingte Zelluntergang jedoch inhibiert (Garcia-Lloret et al. 1996, Garcia-Lloret et al. 2000, Chan et al. 2002), was auch erklärt, dass bei der üblicherweise unter Zusatz von EGF durchgeführten Trophoblastenkultivierung kein früher Zellverlust eintritt. Inwieweit sich die HCMV-vermittelte Apoptose in vivo in Anwesenheit der verschiedenen Regulatoren auswirkt, ist kaum abzuschätzen.

Der Nachweis von infektiösem HCMV im Kulturüberstand infizierter Trophoblastenkulturen wurde in der vorliegenden Arbeit qualitativ durch Übertragung auf Fibroblastenkulturen geführt; auf einen quantitativen Nachweis wurde verzichtet. Frühere Untersuchungen haben übereinstimmend die Freisetzung von infektiösem HCMV gezeigt, wobei die Virusmenge im Überstand, verglichen mit infizierten Fibroblastenkulturen, deutlich geringer ist (Halwachs-Baumann et al. 1998, Fisher et al. 2000). Die in Trophoblasten gebildeten Virionen scheinen überwiegend zellgebunden zu bleiben, was auf eine mögliche intrazelluläre Akkumulation hinweist (Hemmings et al. 1998, Hemmings & Giulbert 2002). Es gibt Untersuchungen, die nahe legen, dass HCMV-infizierte Trophoblasten das Virus auf Stroma- und Endothelzellen übertragen (Halwachs-Baumann et al. 1998, Gabrielli et al. 2001, Pereira et al. 2003, McDonagh et al. 2006) und so als Eintrittspforte für die fetale Infektion fungieren können. Dafür spricht auch, dass auf die in Trophoblasten beobachtete niedrige Replikationsrate nach Zell-zu-Zell-Übertragung eine hohe Replikationsrate in Stromazellen folgt (Gabrielli et al. 2001).

#### **4.2 Entwicklung eines ELISA-basierten Mikroneutralisationstest für plazentare Zelllinien**

Ob eine HCMV-Infektion in der Schwangerschaft zu einer plazentaren Infektion führt und unter welchen Umständen es zur vertikalen Transmission kommt, ist von zahlreichen Faktoren wie z. B. Viruspathogenität, Co-Infektionen, Gestationsalter zum Zeitpunkt der Infektion und sicher in hohem Maße von der mütterlichen Immunantwort abhängig. So stellt die mütterliche Primärinfektion einen Hauptrisikofaktor für intrauterine Transmission und schwere Embryofetopathien dar. Eine präkonzeptionelle Immunität senkt das konnatale Infektionsrisiko entscheidend, stellt jedoch keinen sicheren Schutz dar. Seitens der humoralen Immunantwort gegen HCMV sind neutralisierende Antikörper von entscheidender Bedeutung. Es gibt Hinweise, dass die neutralisierende Antikörper-Antwort mit dem Schutz vor einer Reinfektion korreliert (Adler et al. 1995) und den Schweregrad des Krankheitsverlaufs beeinflussen kann (Schoppel et al. 1998). Im Zusammenhang mit der intrauterinen Transmission konnte bisher keine eindeutige Korrelation von neutralisierender Antikörperantwort und Übertragungs- oder Schädigungsrate nachgewiesen werden. Die neutralisierende Antikörperantwort bei einer Primärinfektion unterliegt einer verzögerten Zeitkinetik (Pass et al. 1983, Schoppel et al. 1997, Eggers et al. 1998, Zanghellini et al. 1999). Daher ist die Bestimmung der NT-Antwort für die Unterscheidung zwischen einer Primärinfektion und einer rekurrenden oder serologisch älteren Infektion von großem Nutzen. Der Nachweis neutralisierender Antikörper erfolgt zumeist durch den konventionellen Mikroneutralisationstest unter routinemäßiger Verwendung von HFF oder embryonalen Lungenfibroblasten (Rasmussen et al. 1984, Gonczol et al. 1986, Braun & Schacherer 1988, Andreoni et al. 1989, Leogrande et al. 1992). Zur Visualisierung infizierter Zellen können z. B. die immunzytochemische Färbung mit Fluorescein-gekoppelten Sekundärantikörpern oder Biotin/Streptavidin-Immunperoxidase-Färbung eingesetzt werden. Der konventionelle Mikroneutralisationstest zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus und erlaubt eine Quantifizierung der Neutralisationskapazität einzelner Seren. Demgegenüber stehen aber als

Nachteile aber die zeitintensive und untersucherabhängige Auswertung durch Auszählen unter dem Mikroskop.

Um dieses für die Testung großer Probenserien ungeeignete Verfahren zu automatisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein ELISA eingesetzt, basierend auf der von Mangin (2004) auf HFF etablierten Methode mit einigen Modifikationen. Für aussagekräftige, verlässliche Ergebnisse im ELISA sind gleichmäßige Monolayer ohne wesentliche Zellverluste sowie eine gleichmäßige Fixierung die Voraussetzung. Bei ungleichmäßiger Verteilung oder teilweiser Ablösung der Zellen werden die Ergebnisse verfälscht und z. B. wird aus einer falsch-niedrigen Extinktion auf einen falsch-hohen Neutralisationstiter geschlossen. Die konventionelle Auswertung gewährt diesbezüglich mehr Spielraum, da das Verhältnis infizierter zu nicht-infizierten Zellen gleich bleibt. In Vorversuchen wurden die Zellkulturbedingungen, d. h. die optimale Zellzahl, das Fixierungsverfahren sowie eine Beschichtung der Mikrotiterplatten getestet. Um vor Testbeginn das Anwachsen und Konfluieren der jeweiligen Zellen zu gewährleisten, wurden diese über einen definierten Zeitraum kultiviert, bevor die Infektion bzw. die Zugabe des Neutralisationsgemischs aus Virus und Serumverdünnung erfolgte. Die Vorgehensweise anderer Autoren, bei denen die Zellen in Suspension mit dem Neutralisationsgemisch inkubiert werden (Gonczol et al. 1986, Gupta et al. 1996), ist ungeeignet für Zellen, die länger für Proliferation oder das Anwachsen und Konfluieren benötigen. Entsprechend ihrer raschen Proliferation waren bei HFF eine Aussaat mit  $10^4$  / Well und 16 h in Kultur ausreichend; für die plazentare Endothelzelllinie HPEC-A1 und die Trophoblasten-verwandte Zelllinie AC1-M88 waren angesichts der langsameren Proliferation  $10^4$  Zellen / Well in Kombination mit einer Kultivierung über 48 h ideal. Die Fixierung mit 5%igem Eisessig führte zu einer nur minimalen Zellablösung und gleichmäßigen Fixierung. Insbesondere wegen der geringen Zellablösung war Eisessig der Verwendung von Paraformaldehyd überlegen. Verschiedene Beschichtungen der Mikrotiterplatten verbesserten die Zellhaftung nicht und wurden daher im Weiteren nicht durchgeführt.

Bei den Trophoblasten muss die angestrebte Differenzierung zu Synzytiotrophoblasten einkalkuliert werden. Die für Trophoblasten notwendige Aussaat in hoher Dichte ( $3 \times 10^5$  Zellen / Well) erklärt sich zum einen daraus, dass primäre villöse Trophoblasten im Gegensatz zu den anderen verwendeten Zelllinien in vitro nicht fähig sind zu proliferieren, zum anderen sind die Zellen gegenüber jeglicher Manipulation wie Waschen, Fixieren, Färben besonders empfindlich und es muss zumindest mit einem geringen Zellverlust während der Testschritte gerechnet werden. Nach einer 48-stündigen Kultivierung waren die Trophoblasten konfluent und adhärent und der Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung zu Synzytien erreicht, sodass dieser Zeitpunkt für die HCMV-Infektion gewählt wurde. Der verzögerten Antigenkinetik der HCMV-Infektion von Trophoblasten wurde danach mit einer Zeitspanne von 48 h bis zur Fixierung der Zellen Rechnung getragen. Während mit HFF und auch den plazentaren Zelllinien HPEC-A1 und AC1-M88 kaum Probleme mit Zellverlusten und -ablösung auftraten, ist die Durchführung eines Mikroneutralisationstestes mit Trophoblasten-Primärkulturen wegen deren Empfindlichkeit gegenüber jeglichen Einflüssen entscheidend schwieriger. Die Vielzahl der Testschritte ist hier von Nachteil und erfordert äußerste Sorgfalt bei der Testdurchführung. Werden die spezifischen Eigenschaften insbesondere der primären Trophoblasten beachtet und während des Testablaufs konsequent die Monolayer mikroskopisch überprüft, steht mit diesem Verfahren erstmals ein Mikroneutralisationstest für plazentare Zelltypen zur Verfügung.

Wichtig für die Auswertung im ELISA ist das Verhältnis der Extinktionen bei maximaler Infektion zur Extinktion der Negativ-Kontrolle (Hintergrundsignal). Je größer die Differenz dieser beiden Werte ist, desto genauer kann die Neutralisationskapazität bestimmt werden. Bei dem verwendeten ELISA-Photometer haben Extinktionswerte zwischen 0,5 und 2,0 die größte Aussagekraft. Wie von Mangin (2004) gezeigt wurde, spielt die Konzentration des Primär-Antikörpers verglichen mit der Konzentration des Sekundärantikörpers eine untergeordnete Rolle. Die Konzentrationen von Primär- und Sekundärantikörper wurden entsprechend dem Protokoll von Mangin mit 1:2000 bzw. 1:1000 gewählt. In Übereinstimmung mit anderen

Autoren (Rasmussen et al. 1984, Gupta et al. 1996, Klein et al. 1999) konnte hier kein relevanter Effekt durch Komplement auf die NT-Titer-Höhe festgestellt werden. Die Seren wurden vor Versuchsbeginn standardmäßig komplement-inaktiviert.

Die Überprüfung von Funktionalität und Reproduzierbarkeit der Testmethode für die verschiedenen Zelllinien konnte anhand mehrfacher Untersuchungen mit HCMV-positiven und -negativen Seren sowie Seren primärinfizierter Schwangerer die Verlässlichkeit der Ergebnisse belegen. Um die ELISA-basierte Methode mit dem konventionellen Neutralisationstest direkt zu vergleichen, wurden die im Vorfeld im Rahmen der Schwangerschaftsdiagnostik bestimmten Neutralisationstiter der Seren den im ELISA-NT-Test auf HFF als Standardzelltyp bestimmten Werten gegenübergestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Serumverdünnungen war die Vergleichbarkeit zwar eingeschränkt, jedoch lagen die Werte beider Testverfahren durchweg im ähnlichen Bereich und zeigten annähernd übereinstimmende NT-Titer. In beiden Verfahren wurden übereinstimmend Titer-Anstiege oder NT-Serokonversionen bei Verlaufsseren festgestellt.

Ein anderer ELISA-basierter Mikroneutralisationstest wurde 1996 von Gupta et al. beschrieben. Die Autoren fanden dabei optimale Messvoraussetzungen durch Detektion eines späten Antigens mittels eines monoklonalen Maus-Antikörpers nach Inkubation von 7 Tagen und Lyse der Zellen durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen der Monolayer. Der Nachweis eines späten Antigens wurde einem frühen vorgezogen, da bei Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen E-Antigen Reaktionen mit den nicht-infizierten Zellen auftraten. Auch bei Nachweis eines IE-Antigens wird eine erschwerte Auswertung wegen hoher Hintergrundextinktion beschrieben (Tomiya et al., 1993). Die Testergebnisse wurden mit dem IgG-ELISA und der konventionellen mikroskopischen Auswertung mittels CPE-Nachweis verglichen, wobei für den IgG-ELISA eine bessere Korrelation nachgewiesen wurde. In der vorliegenden Arbeit bestätigten sich die Schwierigkeiten bei der ELISA-Auswertung mit dem IE-Antigen-Nachweis nicht, sodass mit der automatischen Auswertung eine deutliche Zeitersparnis zu erreichen war. Es fand sich zudem eine gute

Übereinstimmung mit dem konventionellen Mikroneutralisationstest. Tomiyama et al. (1993) konnten ebenfalls mit einem ELISA-basierten Mikroneutralisationstest, der auf dem Nachweis von HCMV-IE-Antigen beruht, eine gute Korrelation mit dem konventionellen Plaque-Reduktionstest nachweisen. Der ELISA-Test zeigte eine höhere Sensitivität und war für die Quantifizierung der NT-Titer ebenso geeignet wie der konventionelle Test. Im Vergleich zum konventionellen Vorgehen bietet die ELISA-basierte Methode eine hohe Objektivität bei geringerem Zeitaufwand und ist damit auch für die Durchführung größerer Testreihen geeignet.

#### ***4.3 Vergleich der NT-Titer-Profile von HCMV-Antiseren bei Testung mit HFF und plazentaren Zelllinien***

Anhand des nun insbesondere auch für primäre Trophoblasten zur Verfügung stehenden Mikroneutralisationstests wurde der Neutralisationseffekt der Immunsereen HCMV-primärinfizierter Schwangerer auf die Infektion der verschiedenen Zelltypen untersucht. Besonderes Interesse galt dabei dem Effekt der Seren auf die Trophoblasteninfektion, da die direkt an der maternofetalen Grenzfläche lokalisierten Zellen einerseits eine potentielle Eintrittspforte für HCMV darstellen und andererseits in direktem Kontakt mit mütterlichem Blut und darin enthaltenen Komponenten der mütterlichen Immunantwort stehen.

Generell waren die mit plazentaren Zelllinien bestimmten Neutralisationstiter signifikant höher als bei der Testung mit HFF. Wurden die mit den drei verschiedenen plazentaren Zellen ermittelten NT-Titer für die einzelnen Seren miteinander verglichen, zeigte sich, dass sich die Werte überwiegend um maximal eine Titerstufe unterschieden. Eine Korrelation ergab der Vergleich der NT-Titer von Trophoblasten-Test und NT-Test der beiden anderen plazentaren Zelllinien aber nicht. Auch in Bezug auf die mit HFF bestimmten NT-Titer konnte mit keiner der plazentaren Zelllinien eine regelmäßige Korrelation festgestellt werden: Zum Beispiel konnte bei den 2 Schwangerschaften (Tabelle 3: SS 1.8 und SS 3.1) mit Verlaufsseren, die bei Testung mit HFF einen deutlichen Titer-

Anstieg zeigten, bei den plazentaren Zelltypen nur für Schwangerschaft 1.8 ein Titeranstieg festgestellt werden. Das kleine untersuchte Kollektiv lässt diesbezüglich aber kaum eine Wertung zu.

Die höheren Neutralisationstiter bei der Verwendung der plazentaren Zellen könnten bedeuten, dass deren Infektion besser durch die Antiseren neutralisiert werden kann als die Infektion von Fibroblasten. Es wurde beschrieben, dass der Neutralisationstiter in erster Linie durch die vorhandene Menge neutralisierender Antikörper definiert wird und selbst von der Viruskonzentration weitgehend unabhängig ist (Klein et al. 1999). Da hier gemäß dem Versuchsaufbau für alle Zelllinien das gleiche Neutralisationsgemisch verwendet wurde, ist die Ursache für die deutlich höheren Neutralisationstiter möglicherweise hauptsächlich im anschließenden Infektionsverlauf des jeweiligen Zelltyps zu suchen. Eine mögliche und nahe liegende Erklärung wäre, dass aufgrund einer geringeren Effizienz und verzögerten Kinetik der HCMV-Infektion dieser Zellen im Neutralisationstest eine geringere „Rest-Infektion“ gemessen wird, was durch die höheren Neutralisationstiter ausgedrückt wird. Für Trophoblasten wurde die im Vergleich zu Fibroblasten ineffizientere Infektion sowie die langsamere Replikationskinetik mehrfach beschrieben (Halwachs-Baumann et al. 1998, Hemmings et al. 1998, Chan et al. 2002). Wie die vorliegende und frühere Arbeiten gezeigt haben, benötigen die Trophoblasten höhere Virusmengen für eine produktive Infektion (Hemmings et al. 1998, Chan et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte mit hohen Viruskonzentrationen eine deutliche Steigerung der Infektionseffizienz auf bis zu 95 % IE-positiver Kerne 25 h p.i. erreicht werden. Dennoch ist es vorstellbar, dass trotz methodischer Anpassung mit höherer Virusmenge und längerer Inkubationszeit eine im Vergleich zu den Fibroblasten geringere Infektionseffizienz zum Messzeitpunkt gegeben war, zumal eine gewisse Reduktion der für die Infektion zur Verfügung stehenden Menge an infektiösem Virus durch die Neutralisationsreaktion hinzukommt. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit birgt aber wiederum die Gefahr des Zellverlustes durch Alterung der Kulturen und damit Beeinträchtigung der Ergebnisse.

Auch spezielle Eigenschaften der Zellen wie z. B. die Fähigkeit von Trophoblasten, Interferone zu sezernieren (Aboagye-Mathieson et al. 1996), könnten durch deren antivirale Wirkung zu einer schwächeren Ausprägung der Infektion führen (Bulmer et al. 1990, Sainz et al. 2005). Diesbezüglich ist die Beobachtung interessant, dass die intrauterine Übertragung verschiedener Stämme des Rubella-Virus umgekehrt proportional zu deren Fähigkeit zur Stimulation der plazentaren Interferonsynthese ist (Banatvala et al. 1973).

Auch wenn verschiedene Faktoren bei den plazentaren Zellen zu einem anderen Infektionsverhalten mit konsekutiv höheren NT-Titern führen, konnte die Funktionalität des Neutralisationstestes anhand der typischen Dosis-Wirkungs-Kurven bewiesen werden. Überraschend bleibt aber, dass die NT-Titer eines Serums bei Bestimmung mit den 3 plazentaren Zelltypen mitunter größere Unterschiede aufweisen und dass bei Verlaufsseren mit Nachweis eines eindeutigen NT-Titeranstiegs dies nicht regelmäßig, d. h. unabhängig vom Zelltyp nachzuweisen war. Allerdings wurden nur in 2 Fällen Verlaufsseren mit deutlichen Titeranstiegen getestet, wobei in einem Fall der NT-Titeranstieg auf plazentaren Zellen ausblieb und im anderen Fall wie erwartet nachzuweisen war.

#### ***4.4 Bedeutung der NT-Antikörperantwort für die vertikale Transmission***

Für das hier untersuchte Kollektiv primärinfizierter Schwangerer war der Schwangerschaftsausgang im Hinblick auf eine intrauterine Übertragung bekannt und entsprach mit 5 von 9 Fällen (55,6 %) in etwa der erwarteten bzw. in der Literatur angegebenen Übertragungsrate (Pass et al. 1986, Nigro et al. 2005). Beim Vergleich der Neutralisationstiter von Überträgerinnen gegenüber Nicht-Überträgerinnen fiel auf, dass die mit primären Trophoblasten ermittelten Werte sich signifikant in der Höhe unterscheiden. Bei denjenigen Schwangeren, deren HCMV-Infektion eine kongenitale Infektion zur Folge hatte, lagen die NT-Titer mit Ausnahme eines Serums um 1 - 3 Titerstufen höher (Abb. 11). Höhere NT-Titer beim Trophoblasten-Mikroneutralisationstest scheinen mit einem signifikant höheren Transmissionsrisiko assoziiert zu sein ( $p=0,0476$  Fisher's



Exact Test). Im Gegensatz dazu ließ sich bei der Verwendung der anderen plazentaren Zelllinien wie auch bei den Fibroblasten kein relevanter Unterschied in der NT-Titer-Höhe von Transmittern gegenüber Nontransmittern feststellen. Ein Einfluss des Gestationsalters zum Infektionszeitpunkt auf das Transmissionsrisiko konnte in dem untersuchten Kollektiv ausgeschlossen werden.

Der hier bei Trophoblasten beobachtete Zusammenhang von Neutralisationstiter und maternofetaler Transmission ist nicht überraschend, wenn man Arbeiten anderer Autoren betrachtet. So zeigte eine Untersuchung der anti-gB-Antwort primärinfizierter Schwangerer, dass es hauptsächlich bei denjenigen Frauen zu einer intrauterinen Übertragung kommt, die eine anti-gB-Antwort entwickelten, während das Fehlen einer mütterlichen anti-gB-Antwort dagegen mit einem geringeren Transmissionsrisiko assoziiert zu sein scheint (Eggers et al. 2000b). Zuvor konnte gezeigt werden, dass das Auftreten einer anti-gB-Antwort und der Nachweis einer NT-Antikörper-Antwort überwiegend zeitlich korrelierten. Dies ist naheliegend, da das Glykoprotein gB neben gH ein wichtiges Ziel der neutralisierenden Immunantwort darstellt. In früheren Analysen der neutralisierenden Antikörper-Antwort konnte demonstriert werden, dass ein großer Anteil gegen gB gerichtet ist (Britt et al. 1988, Britt et al. 1990, Liu et al. 1991), und dementsprechend konnte eine Korrelation von anti-gB-Titern und Neutralisationskapazität nachgewiesen werden (Marshall et al. 1992, Kropff et al. 1993, Spaete et al. 1994, Schoppel et al. 1997). In einer anderen Studie zur Antikörperantwort primärinfizierter Schwangerer konnte ebenfalls ein Zusammenhang von anti-gB-Antwort und vertikaler Transmission gefunden werden. Mütter kongenital infizierter Kinder wiesen signifikant höhere anti-gB-Titer auf als Mütter, die HCMV nicht übertrugen (Boppana & Britt 1995). Jedoch fiel eine Diskordanz von anti-gB- und NT-Titerhöhe auf. So fand sich bei Transmittern eine Korrelation mit hohen anti-gB-Titern einerseits und niedrigeren NT-Titern sowie geringerer Avidität andererseits. Bezüglich der Diskrepanz von anti-gB- und NT-Titer könnte die Beobachtung eine Rolle spielen, dass das Ausmaß der anti-gB-Beteiligung an der neutralisierenden Antikörper-Antwort abhängig vom Infektionsstadium variieren kann und bei

früherer HCMV-Infektion höher ist als bei einer akuten Infektion (Park et al. 2000). Eine denkbare Erklärung wäre, dass anti-gB-Antikörper aufgrund der noch niedrigen Avidität bei einer HCMV-Primärinfektion eine geringere Neutralisationskapazität aufweisen. Zudem wäre es möglich, dass im frühen Stadium der Infektion vermehrt neutralisierende Antikörper gegen andere Virusantigene produziert werden und diese vorwiegend das Ausmaß der Neutralisation bestimmen. Eine weitere Option wäre, dass vorwiegend anti-gB-Antikörper produziert werden, die gegen nicht-neutralisierende Epitope von gB gerichtet sind. Letzteres ist wenig wahrscheinlich, wie eine Analyse gezeigt hat, bei der für primärinfizierte Schwangere und seropositive Gesunde gleiche Antikörperprofile gegen verschiedene Antikörperbindungsstellen von gB gefunden wurden (Hayes et al. 1987).

Ein Zusammenhang von NT-Titerhöhe und dem Schwangerschaftsausgang bei mütterlicher Primärinfektion, wie er von Boppana & Britt 1995 beobachtet wurde, konnte dagegen in anderen Analysen nicht bestätigt werden (Eggers et al. 1998). In Übereinstimmung damit konnte auch in der vorliegenden Arbeit, bei Betrachtung der Standardtestung mit Fibroblasten, keine Korrelation von NT-Titerhöhe und Transmissionsrisiko festgestellt werden. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit sowie der Arbeiten anderer Autoren sprechen gegen Defizite der maternalen antiviralen Antikörper-Antwort als Ursache oder Risikofaktor für die Virusübertragung und kindliche Schädigung bei mütterlicher Primärinfektion. Eine mütterliche anti-gB-Anwort lässt keine Reduktion des Transmissionsrisikos im Sinne einer protektiven Wirkung erwarten. Als indirekte Ursachen für höhere gB-Antikörpertiter bei Überträgerinnen ist deren Induktion durch eine hohe Viruslast oder durch die Pathogenität des Virusstammes vorstellbar. Die höheren Antikörpertiter könnten aber auch Ausdruck einer Reaktion auf eine schwächere zelluläre Immunität der Mutter sein. Frühere Arbeiten von Gehrz et al. lassen diesen Aspekt nicht unwahrscheinlich erscheinen (Gehrz et al. 1981).

#### **4.5 Korrelation von NT-Titerhöhe und Transmissionsrisiko im Trophoblasten-NT-Test**

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Assoziation von NT-Titerhöhe und Transmissionsrisiko konnte interessanterweise einzig im Trophoblasten-NT-Test nachgewiesen werden. Dass in der Standardtestung mit Fibroblasten keine derartige Korrelation nachzuweisen war, deckt sich mit Ergebnissen anderer Autoren. Die Ursache für dieses Phänomen ist unklar, es ist aber nahe liegend, dass spezifische Interaktionen zwischen Trophoblasten und Virus-Antikörpergemisch zugrunde liegen. In diesem Zusammenhang könnte der von Synzytiotrophoblasten exprimierte neonatale IgG-Fc-Rezeptor (FcRn) von Bedeutung sein, welcher mütterliches IgG bindet und durch Rezeptor vermittelte Endozytose zum Feten transportiert (Story et al. 1994, Simister et al. 1996, Leach et al. 1996, Firan et al. 2001). Analysen von Plazenta-Gewebeproben lassen darauf schließen, dass HCMV-Virionen durch Internalisation und Transzytose von Immunkomplexen über den neonatalen Fc-Rezeptor den Synzytiotrophoblasten passieren und den darunterliegenden Zytotrophoblasten sowie villöse Stromazellen infizieren können (Fisher et al. 2000, Maidji et al. 2002, Pereira et al. 2003, Maidji et al. 2006, McDonagh et al. 2006). Daneben spricht der Nachweis sowohl von HCMV-DNA und Nukleokapsiden im Synzytiotrophoblasten-Zytoplasma als auch von IgG-gB-Immunkomplexen in Caveolae für verschiedene Mechanismen des Virus-Eintritts. Für Ausmaß und Verteilungsmuster der plazentaren HCMV-Infektion konnte ein Zusammenhang mit der mütterlichen NT-Antikörperantwort gezeigt werden (Pereira et al. 2003, Maidji et al. 2006). Während bei hoher NT-Aktivität eine Retention von IgG-gB-Immunkomplexen in Synzytiotrophoblasten ohne gleichzeitige Infektion gezeigt werden konnte, waren bei niedriger NT-Aktivität vorwiegend Replikationsproteine in Zytotrophoblasten sowie in villösen Stromazellen festzustellen, teils unter Aussparung der Synzytiotrophoblasten. Mütterliche Antikörper scheinen also abhängig von der Ausprägung der maternalen Immunität entweder zu schützen oder aber die plazentare Infektion zu fördern.

Bei den beschriebenen Untersuchungen handelte es sich um Gewebeproben und Antikörperpräparationen seropositiver Spenderinnen, sodass die Beobachtungen nicht direkt auf die plazentare Infektion bei HCMV-Primärinfektionen übertragen werden können. Bei HCMV-Primärinfektion liegen bekanntermaßen andere Antikörperprofile vor als bei früherer Infektion. Alle in der vorliegenden Arbeit getesteten Seren wiesen bei der NT-Testung mit Fibroblasten niedrige NT-Titer auf. Als Ursache für den Zusammenhang von NT-Titerhöhe und Transmissionsrisiko im Trophoblasten-NT-Test ist eine Modulation der Trophoblasten-Infektion durch Unterschiede in der Antikörperkonstellation von Transmittern und Nontransmittern vorstellbar. Dabei kommen Unterschiede in der Zusammensetzung sowohl von neutralisierenden als auch von nicht neutralisierenden Antikörpern in Betracht.

Die höheren NT-Titer bei Transmittern implizieren eine schwächere Infektion von Trophoblasten in Anwesenheit von Transmitter-Seren, was paradox erscheint. Spekulativ könnte man annehmen, dass in Transmitter-Seren enthaltene Antikörper eine verstärkte Aufnahme von Virion-Antikörperkomplexen über die Fc-Rezeptoren vermitteln. In vivo würde man infolgedessen die für intakte Plazenta-Gewebeteile demonstrierte produktive Infektion erwarten. Im hier verwendeten in vitro-Modell hat die Internalisation von Virion-IgG-Komplexen im Synzytiotrophoblasten-Monolayer aber möglicherweise kaum eine produktive Infektion zur Folge. Dies erscheint aufgrund der Beobachtung von Transzytose von Virion-Antikörperkomplexen und Infektion der Zytotrophoblastenschicht teils unter Aussparung der Synzytiotrophoblasten in intakten Gewebeteilen nicht unwahrscheinlich. Als indirekter Hinweis für diese Vorstellung kann auch gewertet werden, daß in der vorliegenden Arbeit in Abwesenheit von Antiseren eine ausgeprägte Infektion von Synzytiotrophoblasten erreicht werden konnte, während die Produktivität der Infektion in Anwesenheit von Antikörpern deutlich geringer war, wie die hohen NT-Titer implizierten.

Warum es in Anwesenheit von Nontransmitter-Seren zu einer im Vergleich stärkeren Infektion des Synzytiotrophoblasten-Monolayers kommt, bleibt aber unklar. Die in vitro erzeugte hohe Viruskonzentration mit evtl. vermehrter

Aufnahme freier Virionen könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Es ist spekulativ, aber denkbar, dass die Aufnahme freier Virionen geringer ist, wenn, wie hier im Falle der Transmitter vermutet, eine ausgeprägte Internalisation von Virionen über Fc-Rezeptor vermittelten Transport von Immunkomplexen stattfindet.

Die Vorstellung einer verstärkten Aufnahme von Virus-Antikörperkomplexen lässt an das Phänomen des Antibody dependent enhancement (ADE) denken. Der Begriff steht für eine Verstärkung der Infektiosität durch Opsonierung mit Antikörpern und wurde für verschiedene Viren wie z. B. Dengue-Virus (Kliks et al. 1988), HIV-1 (Takeda et al. 1988, Homsy et al. 1990, Toth et al. 1991), RS-Virus (Krilow et al. 1989, Gimenez et al. 1989, Gimenez et al. 1996), Influenza-A-Virus (Ochiai et al. 1990), West Nile Virus (Peiris et al. 1982) und Masern-Virus (Iankov et al. 2006) beschrieben. Es werden zwei Formen des ADE unterschieden: Das Komplement vermittelte C-ADE und das Komplement-unabhängige Fc-Rezeptor vermittelte FcR-ADE. Man stellt sich vor, dass es Antikörper-vermittelt über Fc-Rezeptoren, oder durch Komplementproteine vermittelt über Komplementrezeptoren, zu einer Annäherung und Einschleusung von Antikörper-Virion-Immunkomplexen kommt. Ebenso kann die Immunkomplex-Bindung an den Rezeptor infolge der Annäherung eine Interaktion des Virus mit dem Virusrezeptor auf der Zelloberfläche erleichtern. Des Weiteren können durch Antikörperbindung verursachte Konformationsänderungen über Erleichterung der Virus-Zellfusion oder Komplement-vermittelte unspezifische stimulatorische Effekte auf die Zielzelle zum ADE führen. Welche exakten Umstände ein ADE verursachen, ist bisher ungeklärt. Bestimmte Virus-Epitope können ADE vermittelnde Antikörper induzieren, wobei sowohl nicht-neutralisierende Antikörper sowie neutralisierende Antikörper in subneutralisierenden Konzentrationen eine Rolle spielen können. Für die atypischen Masern, eine schwere Verlaufsform der Infektion, die nach Impfung mit einer Formalin-inaktivierten Vakzine beobachtet wurde, konnte die Ursache in der Induktion einer Hämagglutinin-spezifischen und FcR-ADE vermittelnden Antikörperantwort gefunden werden (Iankov et al., 2006). Die Immunisierung resultierte in einer ungleichen Induktion von

Antikörpern gegen die Oberflächen-Glykoproteine H (Hämagglutinin) und F (Fusionsprotein) mit Überwiegen von Hämagglutinin-Antikörpern. Für diese konnte ein FcR-ADE gezeigt werden, was wahrscheinlich aufgrund des Ungleichgewichts der Antikörperantwort zu dem schweren Infektionsverlauf führen kann.

Für monoklonale Antikörper gegen Oberflächenproteine des RS-Virus konnte gezeigt werden, dass bestimmte Antikörper entweder neutralisierende oder verstärkende Eigenschaften haben und den Infektionsverlauf entsprechend beeinflussen. Bei Kombination zweier verstärkender Antikörper zeigte sich ein synergistischer Effekt, während bei Kombination von verstärkenden und neutralisierenden Antikörpern insbesondere bei hohen Konzentrationen neutralisierender Antikörper kein Enhancement festzustellen war (Gimenez et al. 1996). Für HIV-1 konnten bestimmte Epitope identifiziert werden, die für die Induktion ADE-vermittelnder Antikörper verantwortlich sind (Lee et al. 1994), wobei solche Antikörper nicht in jedem HIV-Antiserum nachweisbar sind (Homsy et al. 1990, Laurence et al. 1990). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Antikörperwirkung abhängig vom jeweiligen Virusstamm neutralisierend oder verstärkend sein kann (Kliks et al. 1993). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass ADE-vermittelnde Antikörper bei der HIV-Infektion für das Risiko einer intrauterinen maternofetalen Übertragung von Bedeutung sind (Kliks und Levy 1994, Lallemand et al. 1994, Markham et al. 1994).

ADE wird typischerweise in Anwesenheit geringer Konzentrationen neutralisierender Antikörper beobachtet. Es ist durchaus möglich, dass eine Antikörper-vermittelte Verstärkung nur bei Primärinfektionen zum Tragen kommt, da höhere Konzentrationen neutralisierender Antikörper das Phänomen überdecken oder aufheben können. Hierzu passt die Beobachtung eines ADE-Phänomens bei SIV-primärinfizierten Makaken, dessen Ausprägung mit dem Anstieg der neutralisierenden Antikörperkonzentration abnahm (Montefiori et al. 1995). Vor diesem Hintergrund ist die im Tiermodell festgestellte protektive Wirkung einer passiven Immunisierung mit neutralisierenden Antikörpern bei CMV-primärinfizierten, tragenden Meerschweinchen nicht überraschend (Chatterjee et al. 2001). Ebenso konnte durch Hyperimmunglobulingabe eine

signifikante Reduktion von Transmissions- und Schädigungsrate bei primärinfizierten Schwangeren demonstriert werden (Nigro et al. 2005).

Zur Klärung der Bedeutung eines potentiellen ADE-Phänomens und Identifikation von FcR-ADE vermittelnden Antikörpern bei HCMV-Primärinfektionen sind weiterführende Experimente notwendig. Die Erkenntnisse wären insbesondere auch für die Generierung einer HCMV-Vakzine wichtig, wie das Beispiel der atypischen Masern gezeigt hat.

#### ***4.6 Bedeutung eines organtypischen Zellkulturmodells für die Risikoabschätzung einer kongenitalen HCMV-Infektion***

Der Trophoblasten-NT-Test bietet ein in-vitro-Modell zur Untersuchung der Wirkung mütterlicher Immunsereen auf die HCMV-Infektion von Synzytiotrophoblasten an der maternofetalen Grenzfläche. Durch Standardisierung der Testbedingungen wie Gestationsalter der verwendeten Plazenten, Zellzahl, Viruspräparation und automatisierte Auswertung etc. konnten Störfaktoren, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, minimiert werden. Bei der Interpretation der Resultate ist bedenkenswert, daß keine homologe Testung möglich war. So können z. B. mögliche Einflüsse durch unterschiedliche Virusstämme, die zu mütterlicher Primärinfektion und Antikörperinduktion führten, nicht beurteilt werden. Zudem ist ein potentieller Einfluss durch unterschiedliche Spenderzell-Eigenschaften nicht auszuschliessen. Wesentliche Qualitätsunterschiede der Spenderzellen konnten aber durch mikroskopische Kontrolle der Trophoblastenkulturen und ausschließliche Verwendung von konfluenten, differenzierenden Monolayern ausgeschlossen werden.

Es scheint, dass das Modell - in Ermangelung der natürlichen plazentaren Strukturen und der Möglichkeit einer homologen Testung - nicht direkt auf die Vorgänge in vivo übertragbar ist. Die Interpretation der höheren NT-Titer bei Transmittern ist spekulativ; dennoch kann man daraus schließen, dass Unterschiede der humoralen Immunantwort das Transmissionsrisiko beeinflussen. Zur weiteren Klärung der Pathomechanismen wäre die Detektion

von Immunkomplexen in Synzytiotrophoblasten und im Überstand interessant. Des Weiteren könnte eine Analyse der Wirkung von Seren primärinfizierter Schwangerer auf die Infektion von intakten Plazentagewebeteilen hilfreich sein.

Eine mütterliche HCMV-Primärinfektion kann zwar sicher diagnostiziert werden, bisher ist es aber nicht gelungen, ein diagnostisches Kriterium zu finden, welches die Identifikation von Überträgerinnen erlaubt. Die Assoziation von NT-Titerhöhe und Übertragungsrisiko im Trophoblasten-NT-Test ist im Hinblick auf die Risikoabschätzung und Planung einer pränatalen Diagnostik oder präventiven Immunglobulingabe bei primärinfizierten Schwangeren von großer Bedeutung. Der prädiktive Wert wurde hier allerdings an einem kleinen Kollektiv primärinfizierter Mütter festgestellt. Zur Überprüfung der Relevanz sind daher weitere Testungen an einem größeren Kollektiv notwendig. Vorteilhaft ist die leichte Verfügbarkeit von Term-Plazenten. Von Nachteil ist jedoch, dass die Methode insgesamt aufwendig ist und sich daher für die Durchführung von größeren Untersuchungsreihen nur bedingt eignet. Sollte sich der prädiktive Wert an einem größeren Kollektiv bestätigen, stünde damit jedoch ein wertvoller Test zur Vorhersage der Transmitterwahrscheinlichkeit von HCMV-primärinfizierten Schwangeren zur Verfügung.



## **5 Zusammenfassung**

Zur Untersuchung des Einflusses der Antikörperantwort HCMV-primärfizierter Schwangerer auf die maternofetale Übertragung wurde ein Trophoblasten-spezifisches Testsystem entwickelt. Die Trophoblasten wurden aus Term-Plazenten isoliert, die unmittelbar nach der Geburt zur Verfügung gestellt wurden. In den Trophoblasten-Kulturen konnte eine produktive HCMV-Infektion mit einer im Vergleich zu Fibroblasten verzögerten Antigenkinetik gezeigt werden. Die Infektionseffizienz konnte durch hohe Viruskonzentration gesteigert werden. Dies war für die Entwicklung und den zeitlichen Ablauf des Neutralisationstestes von Nutzen.

In einem nächsten Schritt wurde erstmalig ein Mikroneutralisationstest für die Anwendung auf Trophoblasten und zwei weiteren plazentaren Zelltypen entwickelt. Um das beim konventionellen Mikroneutralisationstest zeitintensive und untersucherabhängige Auswertungsverfahren zu umgehen, wurde ein ELISA-basiertes Verfahren eingesetzt. Für die Entwicklung des ELISA-Mikroneutralisationstests wurden zunächst HFF als Standardzelltyp verwendet und die Vergleichbarkeit der NT-Titer-Bestimmung durch die automatisierte Methode und den konventionellen NT-Test überprüft. Die Etablierung des Verfahrens für plazentare Zelllinien gelang unter Berücksichtigung deren spezifischer Eigenschaften mit guter Funktionalität und Reproduzierbarkeit.

Der entwickelte Mikroneutralisationstest konnte nun eingesetzt werden, um den Effekt von HCMV-Antiseren primärfizierter Schwangerer auf die Infektion der verschiedenen Zelllinien zu untersuchen. Auffallend war zum einen, dass die NT-Titer der Seren bei plazentaren Zelllinien generell höher lagen als bei Fibroblasten. Ursächlich können spezifische Infektions-Eigenschaften der Zellen angenommen werden, wobei sowohl eine geringere Infektionseffizienz und langsame Replikationskinetik als auch Charakteristika wie die Fähigkeit zur Interferonsekretion eine Rolle spielen können. Zum anderen konnte beim Vergleich der NT-Titer von Überträgerinnen und Nicht-Überträgerinnen speziell im Trophoblasten-Mikroneutralisationstest eine interessante Korrelation

festgestellt werden: Höhere NT-Titer scheinen mit einem signifikant höheren Transmissionsrisiko assoziiert zu sein. Die Interpretation dieses Phänomens ist spekulativ, man kann aber vermuten, dass spezifische Interaktionen der Zellen mit dem Virus-Antikörpergemisch zu einer Modulation der Trophoblasten-Infektion führen. Angesichts der für Synzytiotrophoblasten beschriebenen Fc-Rezeptor-vermittelten Transzytose von HCMV-IgG-Immunkomplexen ist es vorstellbar, dass es bedingt durch Unterschiede in der Antikörperkonstellation bei Transmittern zu einer verstärkten Internalisation von Virion-Immunkomplexen kommt. Die höheren NT-Titer der Transmitter-Seren erscheinen zwar paradox, könnten aber damit erklärt werden, dass in vitro bzw. im Synzytiotrophoblasten-Monolayer nicht die in vivo zu erwartende produktive Infektion resultiert. Eine verstärkte Aufnahme von Virus-Antikörperkomplexen in Abhängigkeit spezifischer Antikörperkonstellation lässt an das Phänomen des antibody-dependant enhancement (ADE) denken. Zum Nachweis eines solchen Mechanismus sind jedoch weiterführende Experimente notwendig. Die Identifikation von ADE-vermittelnden Antikörpern wäre insbesondere auch für die Entwicklung einer HCMV-Vakzine von Bedeutung.

In dieser Arbeit wurde erstmals der Effekt von Antiseren primärinfizierter Schwangerer auf die HCMV-Infektion von Synzytiotrophoblasten untersucht. Die gezeigte Assoziation von NT-Titerhöhe und Übertragungsrisiko lässt die Vermutung zu, dass es Unterschiede in der humoralen Immunantwort von HCMV-Primärinfizierten gibt, die das Transmissionsrisiko beeinflussen. Sollte sich der prädiktive Wert an einem größeren Kollektiv bestätigen, stünde ein wertvoller Test zur Vorhersage der Übertragungswahrscheinlichkeit einer mütterlichen HCMV-Primärinfektion zur Verfügung. Für eine gezielte Entscheidung zur pränatalen Diagnostik und eventuell Einleitung von präventiven oder therapeutischen Maßnahmen wäre dies von großem Nutzen.

## 6 *Abkürzungsverzeichnis*

|       |  |
|-------|--|
| ADE   | Antibody dependent enhancement                         |
| AMP   | Adenosinmonophosphat                                   |
| CD    | Cluster of Differentiation                             |
| CID   | Cytomegalic Inclusion Disease                          |
| CPE   | zytopathischer Effekt                                  |
| DAPI  | 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid             |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure                                 |
| E     | early  |
| ELU   | embryonale Lungenfibroblasten                          |
| EBV   | Ebstein-Barr-Virus                                     |
| EGF   | Epidermal Growth Faktor                                |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                      |
| Fc-R  | Fc-Rezeptor  |
| FcRn  | neonataler Fc-Rezeptor                                 |
| FCS   | Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum                  |
| FITC  | Fluoreszeinisothiocyanat                               |
| gB    | Glykoprotein B   |
| gH    | Glykoprotein H   |
| GPT   | Glutamat-Pyruvat-Transaminase                          |
| HBSS  | Hank's Balanced Salt Solution                          |
| HCMV  | humanes Cytomegalovirus                                |
| hCG   | humanes Choriongonadotropin                            |
| HFF   | human foreskin fibroblasts, humane Vorhautfibroblasten |
| HHV   | Humanes Herpesvirus                                    |
| HIV   | Humanes Immunodefizienz-Virus                          |
| HLA   | Human Leucocyte Antigen                                |
| HPEC  | human placental endothelial cells                      |
| hPL   | humanes plazentares Laktogen                           |
| HRP   | Horseradish-Peroxidase                                 |
| HSV   | Herpes simplex Virus                                   |

|                |  |
|----------------|--|
| IE             | immediate early  |
| Ig             | Immunglobulin  |
| Kbp            | Kilobasenpaare   |
| KSFM           | Keratinocyten-serumfreies Medium                             |
| L              | late   |
| MCP            | major capsid protein, Hauptkapsidprotein                     |
| MPC            | Magnetic Particle Concentrator                               |
| MHC            | Major Histocompatibility Complex                             |
| MOI            | multiplicity of infection                                    |
| NGS            | normal goat serum, Normales Ziegenserum                      |
| NK-Zellen      | natürliche Killerzellen                                      |
| NT-Titer       | Neutralisationstiter   |
| OPD            | o-Phenylenediamine   |
| ORF            | open reading frame, offener Leserahmen                       |
| PCR            | Polymerase-Kettenreaktion                                    |
| p.i.           | post infectionem   |
| pp             | Phosphoprotein   |
| RS-Virus       | Respiratory Syncytial Virus                                  |
| RT             | Raumtemperatur   |
| SIV            | Simianes Immundefizienz-Virus                                |
| SSW            | Schwangerschaftswoche  |
| SV40           | Simianes Virus 40  |
| TNF            | Tumor-Nekrose-Faktor   |
| T.o.P          | Termination of Pregnancy, Schwangerschaftsabbruch            |
| U <sub>L</sub> | unique long, lange, nicht-repetitive Region des HCMV-Genoms  |
| U <sub>S</sub> | unique short, kurze, nicht-repetitive Region des HCMV-Genoms |

## 7 Literaturverzeichnis

- Aboagye-Mathiesen, G., Tóth, F.D., Zdravkovic, M., Ebbesen, P. (1996). Functional characteristics of human trophoblast interferons. *Am J Reprod Immunol* 35 (4), 309-17.
- Adler, S.P. (1989). Cytomegalovirus and child day care. Evidence for an increased infection rate among day-care workers. *N Engl J Med* 321 (19), 1290-6.
- Adler, S.P. (1995). Immunoprophylaxis against cytomegalovirus disease. *Scand J Infect Dis Suppl* 99, 105-9.
- Adler, S.P., Hempfling, S.H., Starr, S.E., Plotkin, S.A., Riddell, S. (1998). Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 17 (3), 200-6.
- Adler, S.P., Starr, S., Plotkin, S., Hempfling, S., Buis, J., Manning, M., Best, A. (1995). Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J Infect Dis* 171 (1), 26-32.
- Adler, S.P. (1988). Molecular epidemiology of cytomegalovirus: viral transmission among children attending a day care center, their parents, and caretakers. *J Pediatr* 112, 366-372.
- Ahlfors, K., Harris, S., Ivarsson, S., Svanberg, L. (1981). Secondary maternal cytomegalovirus infection causing symptomatic congenital infection. *N Engl J Med* 305 (5), 284.
- Ahlfors, K., Ivarsson, S.A., Harris, S. (1999). Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. *Scand J Infect Dis* 31 (5), 443-57.
- Ahlfors, K., Ivarsson, S.A., Johnsson, T., Svanberg, L. (1982). Primary and secondary maternal cytomegalovirus infections and their relation to congenital infection. Analysis of maternal sera. *Acta Paediatr Scand* 71 (1), 109-13.
- Alford, C., Britt W.J. (1993). *Cytomegalovirus*. New York, Raven Press.
- Andreoni, M., Faircloth, M., Vugler, L., Britt, W.J. (1989). A rapid microneutralization assay for the measurement of neutralizing antibody reactive with human cytomegalovirus. *J Virol Methods* 23 (2), 157-67.
- Aplin, J.D. (1991). Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 99 ( Pt 4), 681-92.
- Babalola, G.O., Coutifaris, C., Soto, E.A., Kliman, H.J., Shuman, H., Strauss, J.F. (1990). Aggregation of dispersed human cytotrophoblastic cells: lessons relevant to the morphogenesis of the placenta. *Dev Biol* 137 (1), 100-8.

- Banatvala, J.E., Potter, J.E., Webster, M.J. (1972). Foetal interferon responses induced by rubella virus. *Ciba Found Symp.* 10, 77-99.
- Bax, C.M., Ryder, T.A., Mobberley, M.A., Tyms, A.S., Taylor, D.L., Bloxam, D.L. (1989). Ultrastructural changes and immunocytochemical analysis of human placental trophoblast during short-term culture. *Placenta* 10 (2), 179-94.
- Beck, S., Barrell, B.G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* 331 (6153), 269-72.
- Beersma, M.F., Bijlmakers, M.J., Ploegh, H.L. (1993). Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *J Immunol* 151 (9), 4455-64.
- Benedict, C.A., Butrovich, K.D., Lurain, N.S., Corbeil, J., Rooney, I., Schneider, P., Tschopp, J., Ware, C.F. (1999). Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J Immunol* 162 (12), 6967-70.
- Benirschke, K., Mendoza, G.R., Bazeley, P.L. (1974). Placental and fetal manifestations of cytomegalovirus infection. *Virchows Arch B Cell Pathol* 16 (2), 121-39.
- Benz, C., Reusch, U., Muranyi, W., Brune, W., Atalay, R., Hengel, H. (2001). Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol* 82 (Pt 9), 2061-70.
- Billstrom, M.A., Johnson, G.L., Avdi, N.J., Worthen, G.S. (1998). Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J Virol* 72 (7), 5535-44.
- Blaschitz, A., Hartmann, M., Dohr, G. (1997). Marker antibodies for an efficient discrimination between trophoblast cells and other cellular components present in human first trimester placenta. *Placenta* 18, A14
- Blaschitz, A., Weiss, U., Desoye, G., Dohr, G. (2001). Die Plazenta: Quelle biomedizinischer Forschung. *Mta Spektrum* 2, 57-62.
- Bloxam, D.L., Bax, B.E., Bax, C.M. (1997). Culture of syncytiotrophoblast for the study of human placental transfer. Part II: Production, culture and use of syncytiotrophoblast. *Placenta* 18 (2-3), 99-108.
- Bodéus, M., Feyder, S., Goubau, P. (1998). Avidity of IgG antibodies distinguishes primary from non-primary cytomegalovirus infection in pregnant women. *Clin Diagn Virol* 9(1), 9-16.
- Boeckh, M., Bowden, R. (1995). Cytomegalovirus infection in marrow transplantation. *Cancer Treat Res* 76, 97-136.
- Bold, S., Ohlin, M., Garten, W., Radsak, W. (1996). Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein b-mediated cell-cell fusion. *J Gen Virol* 77 (Pt 9), 2297-302.

- Boppana, S.B., Britt, W.J. (1995). Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 171 (5), 1115-21.
- Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. (1999). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants born to mothers with preexisting immunity to cytomegalovirus. *Pediatrics* 104 (1 Pt 1), 55-60.
- Boppana, S.B., Pass, R.F., Britt, W.J., et al. (1992). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. *Pediatr Infect Dis J* 11, 93-99.
- Boppana, S.B., Rivera, L.B., Fowler, K.B., Mach, M., Britt, W.J.(2001). Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 344 (18), 1366-71.
- Bowden, R.A. (1991). Cytomegalovirus infection in transplant patients: methods of prevention of primary cytomegalovirus. *Transplant Proc* 23, 136-138.
- Bright, N.A., Ockleford, C.D., Anwar, M. (1994). Ontogeny and distribution of Fc gamma receptors in the human placenta. Transport or immune surveillance? *J Anat* 184 (Pt 2), 297-308.
- Britt, W.J. (1991). Recent advances in the identification of significant human cytomegalovirus-encoded proteins. *Transplant Proc* 23 (3 Suppl 3), 64-9, discussion 69.
- Britt, W.J. (1996). Cytomegalovirus: overview of the virus and its pathogenic mechanisms. *Baillieres Clin Infect Dis* 3, 307-325.
- Britt, W.J., Alford, C.A. (1996). Cytomegalovirus. In: Fields, B.N.; Knipe, D.M. et al. (eds.): *Virology Vol.2, 3rd Edition*, Raven Press, Ney York, Chapter 70.
- Britt, W.J., Auger, D. (1986). Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. *J Virol* 59 (1), 185-8.
- Britt, W.J., Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 39 (5-6), 401-12.
- Britt, W.J., Vugler, L., Butfiloski, E., Stephens, E. (1990). Cell surface expression of human cytomegalovirus (hcmv) gp55-116 (gB): Use of hcmv-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J Virol* 64 (3), 1079-85.
- Britt, W.J., Vugler, L., Stephens, E.B. (1988). Induction of complement-dependent and -independent neutralizing antibodies by recombinant-derived human cytomegalovirus gp55-116 (gB). *J Virol* 62 (9), 3309-18.
- Braun, W., Schacherer, C. (1988). Rapid (24h) neutralization assay for the detection of antibodies to human cytomegalovirus using a monoclonal antibody to an hcmv early nuclear protein. *J Virol Methods* 22 (1), 31-40.
- Bullen, B.E., Bloxam, D.L., Ryder, T.A., Mobberley, M.A., Bax, C.M. (1990). Two-sided culture of human placental trophoblast. Morphology, immunocytochemistry and permeability properties. *Placenta*. 11 (5), 431-50.

- Bulmer, J.N., Johnson, P.M. (1985). Antigen expression by trophoblast populations in the human placenta and their possible immunological relevance. *Placenta* 6, 127.
- Bulmer, J.N., Morrison, L., Johnson, P.M., Meager, A. (1990). Immunohistochemical localization of interferons in human placental tissues in normal, ectopic, and molar pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 22 (3-4), 109-16.
- Burton, G.J., Watson, A.L. (1997). The Structure of the Human Placenta: Implications for Initiating and Defending Against Virus Infections. *Rev Med Virol* 7 (4), 219-228.
- Burton, D.R., Williamson, R.A., Parren, P.W. (2000). Antibody and virus: binding and neutralization. *Virology* 270 (1), 1-3.
- Casteels, A., Naessens, A., Gordts, F., De Catte, L., Bougateg, A., Foulon, W. (1999). Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infections. *J Perinat Med* 27 (2), 116-21.
- Cervar, M., Blaschitz, A., Dohr, G., Desoye, G. (1998). Paracrine regulation of distinct trophoblast functions in vitro by placental macrophages. *Cell Tissue Res* 871, 1-9.
- Cha, T., Tom, E., Kemble, G., Duke, G., Mocarski, E., Spaete, R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70 (1), 78-83.
- Chan, G., Hemmings, D.G., Yurochko, A.D., Guilbert, L.J. (2002). Human cytomegalovirus-caused damage to placental trophoblasts mediated by immediate-early gene-induced tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 161 (4), 1371-81.
- Chatterjee, A., Harrison, C.J., Britt, W.J., Bewtra, C. (2001). Modification of maternal and congenital cytomegalovirus infection by anti-glycoprotein b antibody transfer in guinea pigs. *J Infect Dis* 1; 183(11), 1547-53. Epub 2001 Apr 27.
- Chee, M., Bankier, A., Beck, S., Bohni, R., Brown, C., Cerny, R., Horsnell, V., Hutchison, C., Kouzarides, T., Martignetti, J. et al (1990). Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain ad169. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 125-69.
- Clarson, L.H., Glazier, J.D., Greenwood, S.L., Jones, C.J., Sides, M.K., Sibley, C.P. (1996). Activity and expression of Na(+)-K(+)-ATPase in human placental cytotrophoblast cells in culture. *J Physiol* 15;497 ( Pt 3), 735-43.
- Compton, T., Nowlin, D.M., Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with heparin sulfate. *Virology* 193, 834-841.
- Contractor, S.F., Sooranna, S.R. (1988). Human placental cells in culture: a panning technique using a trophoblast-specific monoclonal antibody for cell separation. *J Dev Physiol* 10 (1), 47-51.



- Cotte, C., Easty, G.C., Neville, A.M., Monaghan, P. (1980). Preparation of highly purified cytotrophoblast from human placenta with subsequent modulation to form syncytiotrophoblast in monolayer cultures. *Vitro*. 16 (8), 639-46.
- Coutifaris, C., Babalola, G.O., Abisogun, A.O., Kao, L.C., Chin, U., Vadillo-Ortega, F., Osheroff, J., Kliman, H.J., Strauss, J.F.(1991). In vitro systems for the study of human trophoblast implantation. *Ann N Y Acad Sci* 622,191-201.
- Crino, J.P. (1999). Ultrasound and fetal diagnosis of perinatal infection. *Clin Obstet Gynecol*. 42, 71-80.
- Daiminger, A., Bäder, U., Enders, G. (2005). Pre-and periconceptional primary cytomegalovirus infection: risk of vertical transmission and congenital disease. *BJOG* 112, 166-172.
- Daniels-McQueen, S., Krichevsky, A., Boime, I. (1987). Isolation and characterization of human cytotrophoblast cells. *Trophoblast Research* 2, 423-445.
- Davison, A., Dolan, A., Akter, P., Addison, C., Dargan, D. Alcendor, D. McGeoch, D., Hayward G. (2003). The human cytomegalovirus genome revisited: Comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 84 (Pt 1), 17-28.
- Daya, D., Sabet, L. (1991). The use of cytokeratin as a sensitive and reliable marker for trophoblastic tissue. *Am J Clin Pathol* 95 (2), 137-41.
- Dehner, L.P., Askin, F.B. (1975). Cytomegalovirus endometritis: report of a case associated with spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 45 (2), 211-4.
- Donner, C., Liesnard, C., Brancart, F., Rodesch, F. (1994) Accuracy of amniotic fluid testing before 21 weeks' gestation in prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn* 14(11), 1055-9.
- Douglas, G.C., King, B.F. (1989). Isolation of pure villous cytotrophoblast from term human placenta using immunomagnetic microspheres. *J Immunol Methods* 119 (2), 259-68.
- Douglas, G.C., King, B.F. (1990). Differentiation of human trophoblast cells in vitro as revealed by immunocytochemical staining of desmoplakin and nuclei. *J Cell Sci* 96 ( Pt 1),131-41.
- Drew, W., Lalezari, J. (1999). Cytomegalovirus: Disease syndromes and treatment. *Curr Clin Top Infect Dis* 19, 16-29.
- Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R.F., Alford, C. (1983). Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* 72 (3), 295-9.
- Eggers, M., Bäder, U., Enders, G. (2000a). Combination of microneutralization and avidity assays: improved diagnosis of recent primary human cytomegalovirus infection in single serum sample of second trimester pregnancy. *J Med Virol* 60 (3), 324-30.

- Eggers, M., Bogner, E., Agricola, B., Kern, H., Radsak, K. (1992). Inhibition of human cytomegalovirus maturation by brefeldin a. *J Gen Virol* 73 (Pt 10), 2679-92.
- Eggers, M., Metzger, C., Enders, G. (1998). Differentiation between acute primary and recurrent human cytomegalovirus infection in pregnancy, using a microneutralization assay. *J Med Virol* 56, 351-258.
- Eggers, M., Radsak, K., Enders, G., Reschke, M. (2000b). Use of recombinant glycoprotein antigens gB and gH for diagnosis of primary human cytomegalovirus infection during pregnancy. *J Med Viro.* 63 (2), 135-42.
- Elek, S.D., Stern, H. (1974). Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero. *Lancet* 1 (7845), 1-5.
- Enders, G. (1985). Vergleich verschiedener serologischer Methoden zum Zytomegalienantikörpernachweis. In: Luthardt, T. (Hrsg.): Transfusionsbedingte Zytomegalovirusinfektionen S.53-67. Steinkopff, Darmstadt.
- Enders, G., Bäder, U., Bartelt, U., Daiminger, A. (2003). Zytomegalievirus- (CMV) – Durchseuchung und Häufigkeit von CMV-Primärinfektionen bei schwangeren Frauen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 46, 426-432.
- Eis, A.L., Brockman, D.E., Pollock, J.S., Myatt, L. (1995). Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human villous and extravillous trophoblast populations and expression during syncytiotrophoblast formation in vitro. *Placenta* 16 (2), 113-26.
- Emery, V.C., Cope, A.V., Bowen, E.F., et al. (1999). The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med* 190, 177-182.
- Faulk, W.P., Temple, A. (1976). Distribution of beta2 microglobulin and HLA in chorionic villi of human placentae. *Nature* 262 (5571), 799-802.
- Feinman, M.A., Kliman, H.J., Caltabiano, S., Strauss, J.F. (1986). 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 63 (5), 1211-7.
- Firan, M., Bawdon, R., Radu, C., Ober, R.J., Eaken, D., Antohe, F., Ghetie, V., Ward, E.S. (2001). The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans. *Int Immunol* 13 (8), 993-1002.
- Fisher, S.J., Cui, T.Y., Zhang, L., Hartman, L., Grahl, K., Zhang, G.Y., Tarpey, J., Damsky, C.H. (1989). Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J Cell Biol* 109 (2), 891-902.
- Fisher, S.J., Genbacev, O., Maidji, E., Pereira, L. (2000). Human cytomegalovirus infection of placental cytotrophoblasts in vitro and in utero: implications of transmission and pathogenesis. *J Virol* 74 (15), 6808-20.
- Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., et al (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 326, 663-667.

- Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F. (2003). Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA* 26; 289(8), 1008-11.
- Fox, H. (1993). The Placenta and Infection. In: *The Human Placenta*, edited by Redman, C.W.G., Sargent, I.L., Starkey, P.M. Blackwell Scientific Publications pp. 313-333.
- Frank, H.G., Gunawan, B., Ebeling-Stark, I., Schulten, H.J., et al. (2000). Cytogenetic and DNA-fingerprint characterization of choriocarcinoma cell lines and a trophoblast/choriocarcinoma cell hybrid. *Cancer Genet Cytogenet* 116 (1), 16-22.
- Gabrielli, L., Losi, L., Varani, S., Lazzaretto, T., Eusebi, V., Landini, M.P. (2001). Complete replication of human cytomegalovirus in explants of first trimestre human placenta. *J Med Virol* 64, 499-504.
- Gallina, A., Simoncini, L., Garbelli, S., Percivalle, E., Pedrali-Noy, G., Lee, K., Erikson, R., Plachter, B., Gerna G., Milanesi, G. (1999). Polo-like kinase 1 as a target for human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein. *J Virol* 73 (2), 1468-78.
- Garcia-Lloret, M.I., Winkler-Lowen, B., Guilbert, L.J. (2000). Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-alpha. A model for hematogenous initiation of placental inflammations. *J Leukoc Biol* 68 (6), 903-8.
- Garcia-Lloret, M.I., Yui, J., Winkler-Lowen, B., Guilbert, L.J. (1996). Epidermal growth factor inhibits cytokine-induced apoptosis of primary human trophoblasts. *J Cell Physiol* 167 (2), 324-32.
- Gaus, G., Funayama, H., Huppertz, B. et al. (1997). Parent cells for trophoblast hybridization I: Isolation of extravillous trophoblast cells from human term chorion laeve. *Trophoblast Research* 10, 181-190.
- Gehrz, R.C., Christianson, W.R., Linner, K.M., Conroy, M.M., McCue, S.A., Balfour, H.H. Jr. (1981). Cytomegalovirus-specific humoral and cellular immune responses in human pregnancy. *J Infect Dis* 143 (3), 391-5.
- Gerna, G., Zipeto, D., Percivalle, E., Parea, M., Revello, M.G., Maccario, R., Peri, G., Milanesi, G. (1992). Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis* 166 (6), 1236-44.
- Gibson, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39 (5-6), 389-400.
- Gibson, W., McNally, L.M., Welch, A.R., et al (1993). Cytomegalovirus maturational proteinase: site-directed mutagenesis used to probe enzymatic and substrata domains. In Michelson S., Plotkin SA (ed). *Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease*. Amsterdam, Elsevier, 21-25.

- Gimenez, H.B., Chisholm, S., Dornan, J., Cash, P. (1996). Neutralizing and enhancing activities of human respiratory syncytial virus-specific antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 3 (3), 280-6.
- Gimenez, H.B., Keir, H.M., Cash, P. (1989). In vitro enhancement of respiratory syncytial virus infection of U937 cells by human sera. *J Gen Virol* 70 ( Pt 1), 89-96.
- Gold, E., Nankervis, G.A. Cytomegalovirus. In Evans, A.S. (ed.) *Viral infections of Humans: Epidemiology and Control*. New York, Elsevier, 1976, 143-146.
- Gonczol, E., Furlini, G., Ianacone, J., Plotkin, S.A. (1986), A rapid microneutralization assay for cytomegalovirus. *J Virol Methods* 14 (1), 37-41.
- Grattan, M.T., Moreno-Cabral, C.E., Starnes, V.A., Oyer, P.E., Stinson, E.B., Shumway, N.E. (1989). Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA* 261 (24), 3561-6.
- Grefte, A., Blom, N., van der Giessen, M., van Son, W., The, T.H. (1993). Ultrastructural analysis of circulating cytomegalic cells in patients with active cytomegalovirus infection: evidence for virus production and endothelial origin. *J Infect Dis* 168 (5), 1110-8.
- Grefte, A., Harmsen, M.C., van der Giessen, M., Knollema, S., van Son, W.J., The, T.H. (1994). Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J Gen Virol* 75 ( Pt 8), 1989-98.
- Greijer, A.E., van de Crommert, J.M., Stevens, S.J., Middeldorp, J.M. (1999). Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays. *J Clin Microbiol* 37 (1), 179-88.
- Griffiths, P.D. (2002). The treatment of cytomegalovirus infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 243-253.
- Griffiths, P.D., Baboonian, C. (1984). A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: final report. *Br J Obstet Gynaecol* 91 (4), 307-15.
- Griffiths, P.D., Grundy, J.E. (1987). Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J* 241 (2), 313-24.
- Grose, C., Weiner, C.P. (1990). Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: two decades later. *Am J Obstet Gynecol* 163 (2), 447-50.
- Gupta, C., Leszczynski, J., Gupta, R., Siber, G. (1996). An enzyme immunoassay based micro-neutralization test for titration of antibodies to human cytomegalovirus (cmv) and its correlation with direct elisa measuring cmv IgG antibodies. *Biologicals* 24 (1), 41-9.
- Hahn, T., Barth, S., Weiss, U, Mosgoeller, W., Desoye G. (1998), Sustained hyperglycemia in vitro downregulates the GLUT1 glucose transport system

- of culture human term placental trophoblast. A mechanism to protect fetal development? *FASEB J* 12 (12),1221-31.
- Hall, C.S., James, T.E., Goodyer, C., Branchaud, C., Guyda, H., Giroud, C.J. (1977). Short term culture of human midterm and term placenta: parameters of hormonogenesis. *Steroids* 30 (4), 569-80.
- Halwachs-Baumann, G., Genser B. (2003). Die konnatale Zytomegalievirusinfektion. Epidemiologie – Diagnose – Therapie. Springer Wien New York.
- Halwachs-Baumann, G., Genser, B., Danda, M., Engele, H., Rosegger, H., Fölsch, B., Maurer, U., Lackner, H., Truschnig-Wilders, M. (2000). Screening and diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: a 5-y study. *Scand J Infect Dis* 32 (2), 137-42.
- Halwachs-Baumann, G., Wilders-Truschnig, M., Desoye, G., Hahn, T., Kiesel, L., Klingel, R., Rieger, P., Jahn, G., Sinzger, C. (1998). Human trophoblast cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Virol* 72, 7598-7602.
- Hamilton (1982). Cytomegalovirus and immunity. *Monogr Virol* 12, 3-26.
- Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., et al. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 357, 513-518.
- Hamprecht, K., Vochem, M., Baumeister, A., et al. (1998). Detection of cytomegaloviral DNA in human milk cells and cell free milk whey by nested PCR. *J Virol Methods* 70 (2), 167-76.
- Hayes, K., Alford, C., Britt, W.J. (1987). Antibody response to virus-encoded proteins after cytomegalovirus mononucleosis. *J Infect Dis* 156 (4), 615-21.
- Hayes, K., Gibas, H. (1971). Placental cytomegalovirus infection without fetal involvement following primary infection in pregnancy. *J Pediatr* 79 (3), 401-5.
- Hemmings, D.G., Guilbert, L.J. (2002). Polarized release of human cytomegalovirus from placental trophoblasts. *J Virol* 76 (13), 6710-6717.
- Hemmings, D.G., Kilani, R., Nykiforuk, C., Preiksaitis, J., Gulibert, L.J. (1998). Permissive cytomegalovirus infection of primary villous term and first trimester trophoblasts. *J Virol* 72 (6), 4970-4979.
- Hengel, H., Brune, W., Koszinowski, U.H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* 6 (5), 190-7.
- Hengel, H., Reusch, U., Gutermann, A., Ziegler, H., Jonjic, S., Lucin, P., Koszinowski, U. (1999). Cytomegaloviral control of mhc class i function in the mouse. *Immunol Rev* 168, 167-76.
- Ho, M. (1991). Cytomegalovirus: Biology and infection. New York, Plenum.
- Homsy, J., Meyer, M., Levy, J.A. (1990). Serum enhancement of human immunodeficiency virus (HIV) infection correlates with disease in HIV-infected individuals. *J Virol* 64 (4), 1437-40.

- Honess, R.W., Roizman, B. (1974). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* 14 (1), 8-19.
- Hsi, B.L., Yeh, C.J., Faulk, W.P. (1982). Human amniochorion: tissue-specific markers, transferrin receptors and histocompatibility antigens. *Placenta* 3 (1), 1-12.
- Hunt, J.S. (1989). Macrophages in human uteroplacental tissues: a review. *Am J Reprod Immunol* 21 (3-4), 119-22.
- Iankov, I.D., Pandey, M., Harvey, M., Griesmann, G.E., Federspiel, M.J., Russell, S.J. (2006). Immunoglobulin g antibody-mediated enhancement of measles virus infection can bypass the protective antiviral immune response. *J Virol* 80 (17), 8530-40.
- Jahn, G., Scholl, B.-C., Traupe, B., Fleckenstein, B. (1987). The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol* 68, 1327-1337.
- Jahn, G., Mach, M. (1990). Human cytomegalovirus phosphoproteins and glycoproteins and their coding regions. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 171-85.
- Jahn, G., Stenglein, S., Riegler, S., et al. (1999). Human cytomegalovirus infection of immature dendritic cells and macrophages. *Intervirology* 42, 365-372.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomik, M. (2001). Immunobiology, 5th edition Garland Publishing, New York.
- Jansen, C.F.M., Toet, M.C., Rademaker, C.M.A., et al. (2005). Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with valganciclovir. *J Perinat Med* 33, 364-366.
- Jin, X., Demoitie, M.A., Donahoe, S.M., Ogg, G.S., Bonhoeffer, S., Kakimoto, W.M., et al. (2000). High frequency of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-effector cells in HLA-A\*0201-positive subjects during multiple viral coinfections. *J Infect Dis* 181 (1), 165-75.
- Kao, L.C., Caltabiano, S., Wu, S., Strauss, J.F., Kliman, H.J. (1988). The human villous cytotrophoblast: interactions with extracellular matrix proteins, endocrine function, and cytoplasmic differentiation in the absence of syncytium formation. *Dev Biol* 130 (2), 693-702.
- Kari, B., Gehrz, R. (1992). A human glycoprotein complex designated gC-II is a major heparin-binding component of the envelope. *J Virol* 66, 1761-1764.
- Karl, P.I., Alpy, K.L., Fisher, S.E. (1992). Serial enzymatic digestion method for isolation of human placental trophoblasts. *Placenta* 13 (4), 385-7.
- Keay, S., Baldwin, B. (1991). Anti-idiotypic antibodies that mimic gp 86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. *J Virol* 65, 5124-5128.

- Kelly, R.W., Critchley, H.O. (1997). A T-helper-2 bias in decidua: the prostaglandin contribution of the macrophage and trophoblast. *J Reprod Immunol* 33 (3), 181-7.
- Khong, T.Y., Lane, E.B., Robertson, W.B. (1986). An immunocytochemical study of fetal cells at the maternal-placental interface using monoclonal antibodies to keratins, vimentin and desmin. *Cell Tissue Res* 246 (1), 189-95.
- Kimberlin, D.W. (2005). Antiviral therapies in children: has their time arrived? *Pediatr Clin North Am* 52, 837-867.
- Kimberlin, D.W., Lin, C.-Y., Sanchez, P.J., et al. for the National Institute of Allergy And Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group (2003) Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomised, controlled trial. *J Pediatr* 143, 16-25.
- Klein, M., Schoppel, K., Amvrossiadis, N., Mach, M. (1999). Strain-specific neutralization of human cytomegalovirus isolates by human sera. *J Virol* 73 (2), 878-86.
- Kliks, S.C., Levy, J.A. (1994). Maternal antibody response and maternal-infant HIV-1 transmission. *Lancet* 343 (8909), 1364.
- Kliks, S.C., Nimmanitya, S., Nisalak, A., Burke, D.S. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 38 (2), 411-9.
- Kliks, S.C., Shioda, T., Haigwood, N.L., Levy, J.A. (1993). V3 variability can influence the ability of an antibody to neutralize or enhance infection by diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (24), 11518-22.
- Kliman, H.J., Feinberg, R.F. (1990). Human trophoblast-extracellular matrix (ECM) interactions in vitro: ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (8), 3057-61.
- Kliman, H.J., Nestler, J.E., Sermasi, E., Sanger, J.M., Strauss, J.F. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118 (4), 1567-82.
- Koszinowski, U., Del, V. M., Reddehase, M. (1990). Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 189-220.
- Kovats, S., Main, E.K, Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S.J, DeMars, R. (1990). A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248 (4952), 220-3.
- Krause, H., Hebart, H., Jahn, G., Muller, C., Einsele, H. (1997). Screening for cmv-specific t cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset cmv disease. *Bone Marrow Transplant* 19 (11), 1111-6.
- Krech, U. (1973). Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull World Health Organ* 49 (1), 103-6.

- Krech, U., Jung, M., Jung, F. (1971). Cytomegalovirus infection of man. Basel, S.Karger, 18.
- Kriel, R.L., Gates, G.A., Wulff, H., Powell, N., Poland, J.D., Chin, T.D. (1970) Cytomegalovirus isolations associated with pregnancy wastage. *Am J Obstet Gynecol* 106 (6), 885-92.
- Krilov, L.R., Anderson, L.J., Marcoux, L., Bonagura, V.R., Wedgwood, J.F. (1989). Antibody-mediated enhancement of respiratory syncytial virus infection in two monocyte/macrophage cell lines. *J Infect Dis* 160 (5), 777-82.
- Kropff, B., Landini, M.P., Mach, M. (1993). An ELISA using recombinant proteins for the detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus. *J Med Virol* 39 (3), 187-95.
- Kumar, M.L., Nankervis, G.A. (1979). Cytomegalovirus infections. *South Med J* 72 (7), 854-61
- Lallemant, M., Baillou, A., Lallemant-Le Cœur, S., Nzingoula, S., Mampaka, M., et al. (1994). Maternal antibody response at delivery and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in African women. *Lancet* 343 (8904), 1001-5.
- Lamy, M.E., Mulongo, K.N., Gadisseux, J.F., Lyon, G., Gaudy, V., Van Lierde, M. (1992). Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 166 (1 Pt 1), 91-4.
- Landini, M., Michelson, S. (1988). Human cytomegalovirus proteins. *Prog Med Virol* 35, 152-85.
- Lang, D.J., Krummer, J.F. (1975). Cytomegalovirus in semen: observations in selected populations. *J Infect Dis* 132, 472-473.
- Laurence, J., Saunders, A., Early, E., Salmon, J.E. (1990). Human immunodeficiency virus infection of monocytes: relationship to Fc-gamma receptors and antibody-dependent viral enhancement. *Immunology* 70 (3), 338-43.
- Lazarotto, T., Ripalti, A., Bergamini, G., Battista, M.C., Spezzacatena, P., et al. (1998). Development of a new cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin M (IgM) immunoblot for detection of CMV-specific IgM. *J Clin Microbiol* 36 (11), 3337-41.
- Lazarotto, T., Spezzacatena, P., Pradelli, P., Abate, D.A., Varani, S., Landini, M.P. (1997). Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 4 (4), 469-73.
- Lazarotto, T., Spezzacatena, P., Varani, S., Gabrielli, L., Pradelli, P., Guerra, B., Landini, M.P. (1999). Anticytomegalovirus (anti-CMV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 6 (1), 127-9.



- Lazzarotto, T., Varani, S., Guerra, B., Nicolosi, A., Lanari, M., Landini, M.P. (2000). Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 137 (1), 90-5.
- Leach, J.L., Sedmak, D.D., Osborne, J.M., Rahill, B., Lairmore, M.D., Anderson, C.L. (1996). Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol* 15; 157 (8),3317-22.
- Le Bouteiller, P., Rodriguez, A.M., Mallet, V., Girr, M., Guillaudeux, T., Lenfant, F. (1996). Placental expression of HLA Class I gene. *Am J Reprod Immunol* 35, 216-225.
- Leogrande, G., Merchionne, F., Lazzarotto, T., Landini, M.P. (1992). Large-scale testing of human serum to determine cytomegalovirus neutralising antibody. *J Infect* 24 (3), 289-99.
- Lee, C.N., Robinson, J., Cheng, Y.L., Essex, M., Lee, T.H. (1994). Influence of deletions in N or C terminus of HIV-1 glycoprotein 120 on binding of infectivity-enhancing antibody. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10 (9), 1065-9.
- Li, L., Coelingh, K. , Britt, W.J. (1995). Human cytomegalovirus neutralizing antibody-resistant phenotype is associated with reduced expression of glycoprotein h. *J Virol* 69 (10), 6047-53.
- Li, C., Greenberg, P, Gilbert, M., Goodrich, J., Riddell, S. (1994). Recovery of hla-restricted cytomegalovirus (cmv)-specific t-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: Correlation with cmv disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83 (7), 1971-9.
- Liu, Y.N., Klaus, A., Kari, B., Stinski, M.F., Eckhardt, J., Gehrz, R.C. (1991). The N-terminal 513 amino acids of the envelope glycoprotein gB of human cytomegalovirus stimulates both B- and T-cell immune responses in humans. *J Virol* 65 (3),1644-8.
- Liu, B., Stinski, M.F. (1992). Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream atf and ap-1 cis-acting elements. *J Virol* 66 (7), 4434-44.
- Ljungman, P. (1996). Cytomegalovirus infections in transplant patients. *Scand J Infect Dis Suppl* 100, 59-63.
- Ljungman, P., Biron, P., Bosi, A., Cahn, J.Y., Goldstone, A.H., Gorin, N.C., Link, H., Messina, C., Michallet, M., Richard, C. et al. (1994). Cytomegalovirus interstitial pneumonia in autologous bone marrow transplant recipients. Infectious Disease Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 13 (2), 209-12.
- Lobo, J.O., Bellino, F.L., Siegel, A. (1987). Characterization of isolated cells in a primary culture from human term placenta by electron microscopy and immunohistochemistry. *Trophoblast Research* 2, 447-460.
- Loke, Y.W. (1990). Experimenting with human extravillous trophoblast: a personal view. *Am J Reprod Immuno.* 24 (1),22-8.

- Loke, Y.W., Burland, K. (1988). Human trophoblast cells cultured in modified medium and supported by extracellular matrix. *Placenta* 9, 173-182.
- Loke, Y.W., Gardner, L., Grabowska, A. (1989). Isolation of human extravillous trophoblast cells by attachment to laminin-coated magnetic beads. *Placenta* 10 (4), 407-15.
- Loke, Y.W., King, A. (1995). *Human implantation: Cell biology and immunology*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Lynch, L., Daffos, F., Emanuel, D., Giovangrandi, Y., Meisel, R., Forestier, F., Cathomas, G., Berkowitz, R.L. (1991). Prenatal diagnosis of fetal cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 165(3), 714-8.
- MacCormac, L.P., Grundy, J.E. (1996). Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (Fc gammaR) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc gammaRs. *J Infect Dis* 174 (6), 1151-61.
- MacCormac, L.P., Grundy, J.E. (1999). Two clinical isolates and the Toledo strain of cytomegalovirus contain endothelial cell tropic variants that are not present in the AD169, Towne, or Davis strains. *J Med Virol* 57(3), 298-307.
- Macher, A.M., Reichert, C.M., Straus, S.E., Longo, D.L., Parrillo, J., Lane, H.C., Fauci, A.S., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Quinnan, G.V. Jr. (1983). Death in the AIDS patient: role of cytomegalovirus. *N Engl J Med* 309 (23), 1454.
- Maidji, E., McDonagh, S., Genbacev, O., Tabata, T., Pereira, L. (2006). Maternal antibodies enhance or prevent cytomegalovirus infection in the placenta by neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. *Am J Pathol* 168 (4), 1210-26.
- Maidji, E., Percivalle, E., Gerna, G., Fisher, S., Pereira, L. (2002). Transmission of human cytomegalovirus from infected uterine microvascular endothelial cells to differentiating/invasive placental cytotrophoblasts. *Virology* 304 (1), 53-69.
- Markham, R.B., Coberly, J., Ruff, A.J., Hoover, D., Gomez, J., Holt, E., et al. (1994). Maternal IgG1 and IgA antibody to V3 loop consensus sequence and maternal-infant HIV-1 transmission. *Lancet* 343 (8894), 390-1.
- Marshall, G., Rabalais, G., Stout, G., Waldeyer, S. (1992). Antibodies to recombinant-derived glycoprotein b after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J Infect Dis* 165 (2) 381-4.
- McDonagh, S., Maidji, E., Chang, H.T., Pereira, L. (2006). Patterns of human cytomegalovirus infection in term placentas: a preliminary analysis. *J Clin Virol* 35 (2), 210-5. Epub 2006 Jan 4.
- McMaster, M.T., Librach, C.L., Zhou, Y., Lim, K.H., Janatpour, M.J., DeMars, R., Kovats, S., Damsky, C., Fisher, S.J. (1995). Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 154 (8), 3771-8.
- Mertens, T.H., Schrappe, M., Gelderbloom H. (1994). In: Classen/ Diehl/ Kocksiek, Innere Medizin. Urban & Schwarzenberg 3.Auflage, p. 400.

- Meyer, H., Bankier, A., Landini, M., Brown, C., Barrell, B., Ruger, B., Mach, M. (1988). Identification and procaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28-kilodalton structural phosphoprotein (pp 28) of human cytomegalovirus. *J Virol* 62 (7), 2243-50.
- Michaels, M.G., Greenberg, D.P., Sabo, D.L., Wald, E.R. (2003). Treatment of children with congenital cytomegalovirus infection with ganciclovir. *Pediatr Infect Dis J* 22, 504-509.
- Modrow, S.F. (1997). *Herpesviren*. Berlin, Spektrum, Akad. Verl.
- Mocarski, E. (2004). Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol* 6, 707-717.
- Mocarski, E., Courcelle, C. (2001). Cytomegaloviruses and their replication. In *Fields virology*, 4 edn. Pp. 2629-2674. Edited by Knipe, D.M., Howley, P.M. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkens.
- Montefiori, D.C., Reimann, K.A., Letvin, N.L., Zhou, J., Hu, S.L. (1995). Studies of complement-activating antibodies in the SIV/macaque model of acute primary infection and vaccine protection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11 (8), 963-70.
- Morrish, D.W., Siy, O. (1986). Critical factors in establishing monolayer cultures of normal human placental cells in serum-free medium. *Endocr Res* 12 (3), 229-53.
- Mostoufi-zadeh, M., Driscoll, S.G., Bianco, S.A., Kundsinn, R.B. (1984). Placental evidence of cytomegalovirus infection of the fetus and neonate. *Arch Pathol Lab Med* 108 (5), 403-6.
- Münz, C., Holmes, N., King, A., Loke, Y.W., Colonna, M., Schild, H., Rammensee, H.G. (1997). Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* 185 (3), 385-91.
- Murph, J.R., Baron, J.C., Brown, C.K., Ebelhack, C.L., Bale, J.F. Jr. (1991). The occupational risk of cytomegalovirus infection among day-care providers. *JAMA* 265 (5), 603-8.
- Murph, J.R., Souza, I.E., Dawson, J.D., Benson, P., et al. (1998). Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. *Am J Epidemiol* 147 (10), 940-7.
- Nahmias, A.J., Panigel, M., Schwartz, D.A. (1994). Hematogenous infections of the placenta – an interdisciplinary and evolutionary perspective. In: *HIV, perinatal infections and therapy*, pp 107-136. Edited by Miller, R.A., Thiede, H.A. University of Rochester Press.
- Nakamura, Y., Ohta, Y. (1990). Immunohistochemical study of human placental stromal cells. *Hum Pathol* 21 (9), 936-40.
- Navarro, D., Paz, P., Tugizov, S., Topp, K., La, V.J., Pereira, L. (1993). Glycoprotein b of human cytomegalovirus promotes virion penetration into

- cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology* 197 (1), 143-58.
- Nelson, D.M., Crouch, E.C., Curran, E.M., Farmer, D.R. (1990). Trophoblast interaction with fibrin matrix. Epithelialization of perivillous fibrin deposits as a mechanism for villous repair in the human placenta. *Am J Pathol* 136 (4), 855-65.
- Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., Best, A.M. (2005). Congenital cytomegalovirus collaborating group. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 353, 1350-1362.
- Nigro, G., Scholz, H., Bartmann, U. (1994). Ganciclovir therapy for symptomatic congenital cytomegalovirus infection in infants: a two-regimen experience. *J Pediatr* 124 (2), 318-22.
- Numazaki, Y., Yano, N., Morizuka, T., et al. (1970). Primary infection with human cytomegalovirus: virus isolation from healthy infants and pregnant woman. *Am J Epidemiol* 91, 410-417.
- Ochiai, H., Kurokawa, M., Kuroki, Y., Niwayama, S. (1990). Infection enhancement of influenza A H1 subtype viruses in macrophage-like P388D1 cells by cross-reactive antibodies. *J Med Virol* 30 (4), 258-65.
- Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U., Helenius, A. (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* 20 (13), 4922-31.
- Oram, J.D., Downing, R.G., Akrigg, A., Dollery, A.A., Duggleby, C.J., Wilkinson, G.W., Greenaway, P.J. (1982). Use of recombinant plasmids to investigate the structure of the human cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 59 (Pt 1), 111-29.
- Pass, R.F. (2005). Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes*. 12, 50-55.
- Pass, R.F., August, A.M., Dworsky, M., Reynolds, D.W. (1982). Cytomegalovirus infection in day-care center. *N Engl J Med* 307 (8), 477-9.
- Pass, R.F., Griffiths, P., August, A. (1983). Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: Comparison of patients with primary and recurrent infections. *J Infect Dis* 147 (1), 40-6.
- Pass, R.F., Hutto, C., Lyon, M.D., Cloud, G. (1990). Increased rate of cytomegalovirus infection among day care center workers. *Pediatr Infect Dis J* 9 (7), 465-70.
- Pass, R.F., Hutto, C., Ricks, R., Cloud, G.A. (1986). Increased rate of cytomegalovirus infection among parents of children attending day-care centers. *N Engl J Med* 314 (22), 1414-8.
- Pass, R.F., Little, E.A., Stagno, S. et al (1987). Young children as a probable source of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 316, 1366-1370.

- Pass, R.F., Stagno, S., Myers, G.J., et al. (1980). Outcome of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of long-term longitudinal follow-up. *Pediatrics* 66, 801-806.
- Peiris, J.S., Porterfield, J.S., Roehrig, J.T. (1982). Monoclonal antibodies against the flavivirus West Nile. *J Gen Virol* 58 (Pt 2), 283-9.
- Pereira, L., Maidji, E., McDonagh, S., Genbacev, O., Fisher, S. (2003). Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenic bacteria and maternal immunity. *J Virol* 77 (24), 13301-14.
- Piccinni, M.P., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Beloni, L., Giannarini, L., et al. (1995). Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155 (1), 128-33.
- Plachter, B., Klages, S., Hagelmann, S. et al. (1990) Prokaryotic expression of phosphorylated tegument protein pp65 of human cytomegalovirus and application of recombinant peptides for immunoblot analysis. *J Clin Microbiol* 28, 1229-1235
- Plachter, B., Sinzger, C., Jahn, G. (1996) Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 46, 195-261.
- Ploegh, H. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* 280 (5361), 248-53.
- Plotkin, S.A., Farquhar, J., Horberger, E. (1976). Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 134 (5), 470-5.
- Plotkin, S.A., Smiley, M.L., Friedman, H.M., Starr, S.E., Fleisher, G.R., Wlodaver, C., Dafoe, D.C., Friedman, A.D., Grossman, R.A., Barker, C.F. (1984). Towne-vaccine-induced prevention of cytomegalovirus disease after renal transplants. *Lancet* 1 (8376), 528-30.
- Podlech, J., Holtappels, R., Pahl-Seibert, M.F., Steffens, H.P., Reddehase, M.J. (2000). Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J Virol* 74 (16), 7496-507.
- Porterfield, J.S., Cardosa, M.J. (1984). Host range and tissue tropisms: antibody-dependent mechanisms. In: Notkins, A.L., Oldstone, M.B.A. (eds). *Concept in viral pathogenesis*, vol.1 Springer Berlin, pp. 117-122.
- Pröll, J., Blaschitz, A., Hartmann, M., Thalhamer, J., Dohr, G. (1996). Human first-trimester placenta intra-arterial trophoblast cells express the neural cell adhesion molecule. *Early Pregnancy* 2 (4), 271-5.
- Quinnan, G., Kirmani, N., Rook, A., Manischewitz, J., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G., Saral R., Burns, W. (1982). Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: Hla-restricted t-lymphocyte and non-t-lymphocyte cytotoxic

- responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med* 307 (1), 7-13.
- Ramirez, M., Virmani, M., Garon, C. , Rosenthal, L. (1979). Defective virions of human cytomegalovirus. *Virology* 96(1), 311-4.
- Ramsey, M.E.B., Miller, E., Peckham, C.S. (1991). Outcome of confirmed symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Arch Dis Child* 66, 1068-1069.
- Rasmussen, L. (1990). Immune response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 154, 222-254.
- Rasmussen, L., Nelson, R. , Kelsall, D., Merigan, T. (1984). Murine monoclonal antibody to a single protein neutralizes the infectivity of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(3), 876-80.
- Reddehase, M.J. (2002). Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2, 831-844.
- Reddehase, M.J., Mutter, W., Münch, K., Bühring, et al. (1987). CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 61 (10), 3102-8.
- Revello, M.G., Zavattoni, M., Furione, M., Lilleri, D., Gorini, G., Gerna, G. (2002). Diagnosis and outcome of preconceptional and periconceptional primary human cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* 186 (4), 553-7. Epub 2002 Jul 19.
- Revello, M.G., Gerna, G. (2004). Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 29 (2), 71-83.
- Revello, M.G., Sarasini, A., Zavattoni, M., Baldanti, F., Gerna, G. (1998). Improved prenatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection by a modified nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* 56 (1), 99-103.
- Revello, M.G., Zavattoni, M., Furione, M., et al. (2006). Preconceptional primary human cytomegalovirus infection and risk of congenital infection. *J Infect Dis* 193, 783-787.
- Richards, R.G., Hartman, S.M., Handwerger, S. (1994). Human cytotrophoblast cells cultured in maternal serum progress to a differentiated syncytial phenotype expressing both human chorionic gonadotropin and human placental lactogen. *Endocrinology* 135 (1), 321-9.
- Riddell, S., Greenberg, P. (1995). Principles for adoptive t cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol* 13, 545-86.
- Riddell, S., Greenberg, P. (1997). T cell therapy of human cmv and ebv infection in immunocompromised hosts [record supplied by publisher]. *Rev Med Virol* 7(3), 181-192.
- Roberts, W.H., Sneddon, J.M., Waldman, J., Stephens, R.E. (1989). Cytomegalovirus infection of gastrointestinal endothelium demonstrated by simultaneous nucleic acid hybridization and immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 113 (5), 461-4.

- Roby, C., Gibson, W. (1986). Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J Virol* 59 (3), 714-27.
- Rojo, P., Ramos, J.T. (2004). Ganciclovir treatment of children with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 23, 88-89.
- Roizman, B., Knipe, D.M., Howley et al. (1996). Herpesviridae. *Fields BN, Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 2221-2230.
- Roizmann, B., Carmichael, L.E., Deinhardt, F. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The herpes virus study group, the international committee on taxonomy of viruses. *Intervirology* 16, 201-217.
- Roizmann, B., Desrosiers, R.C, Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C., Studdert, M.J. (1992). The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 123(3-4), :425-49.
- Roizmann, B., K.D. (2001). *Herpes simplex viruses and their replication*. Philadelphia, Pa, Lippincott-Raven.
- Ross, S.A., Boppana, S.B. (2004). Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis* 16, 44-49.
- Rousseau T, Douvier S, Reynaud I, et al. (2000). Severe fetal cytomegalic inclusion disease after documented maternal reactivation of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Prenat Diagn* 20(4), 333-6.
- Rummelt, V., Rummelt, C., Jahn, G., Wenkel, H., Sinzger, C., Mayer, U.M., Naumann, G.O. (1994). Triple retinal infection with human immunodeficiency virus type 1, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1. Light and electron microscopy, immunohistochemistry, and in situ hybridization. *Ophthalmology* 101 (2), 270-9.
- Rutter, D., Griffiths, P., Trompeter, R.S. (1985). Cytomegalic inclusion disease after recurrent maternal infection. *Lancet* 2 (8465), 1182.
- Sacks, G., Sargent, I., Redman, C. (1999). An innate view of human pregnancy. *Immunol Today* 20 (3), 114-8.
- Sainz, B. Jr., LaMarca, H.L., Garry, R.F., Morris, C.A. (2005). Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Virol J* 23; 2,14.
- Sanchez, V., Greis, K., Sztul, E., Britt, W.J. (2000). Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: Characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* 74 (2), 975-86.
- Sanchez, V., Sztul, E., Britt, W.J. (2000). Human cytomegalovirus pp28 (ul99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment. *J Virol* 74 (8), 3842-51.
- Sargent, I.L. (1993) Maternal and fetal immune responses during pregnancy. *Exp Clin Immunogenet* 10 (2), 85-102.

- Schalasta, G., Eggers, M., Schmid, M., Enders, G. (2000). Analysis of human cytomegalovirus DNA in urines of newborns and infants by means of a new ultrarapid real-time PCR-system. *J Clin Virol* 19 (3), 175-85.
- Schiebler, T.H., Schneider, F. (1991). Histologie. 3.Auflage Springer, Berlin
- Schmon, B., Hartmann, M., Jones, C.J., Desoye, G. (1991). Insulin and glucose do not affect the glycogen content in isolated and cultured trophoblast cells of human term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73 (4), 888-93.
- Schoppel, K., Kropff, B., Schmidt, C., Vornhagen, R., Mach, M. (1997). The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. *J Infect Dis* 175 (3), 533-44.
- Schoppel, K., Schmidt, C., Einsele, H., Hebart, H., Mach, M., (1998). Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 178 (5), 1233-43.
- Schütz, M., Teifel, M., Friedl, P. (1997). Establishment of a human placental endothelial cell line with extended life span after transfection with SV 40 T-antigens. *Eur J Cell Biol* 74 (4), 315-20.
- Schwartz, D.A., Kha, N. R., Stoll, B. (1992). Characterization of the fetal inflammatory response to cytomegalovirus placentitis. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 116 (1), 21-7.
- Simister, N.E., Story, C.M., Chen, H.L., Hunt, J.S. (1996). An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol* 26 (7), 1527-31.
- Sinclair, J., Sissons, P. (2006) Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 87, 1763-1779.
- Sinzger, C., Bissinger, A.L., Viebahn, R., Oettle, H., Radke, C., Schmidt C.A., Jahn, G. (1999). Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and In vivo. *J Infect Dis* 180 (4), 976-86.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., et al. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 76, 741-750.
- Sinzger, C., Jahn, G. (1996) Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 39, 302-319.
- Sinzger, C., Muentefering, H., Loening, T., Stoess, H., Plachter, B., Jahn, G. (1993a). Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. *Virchows Arch A Pathol Anat* 423, 249-256.
- Sinzger, C., Plachter, B., Grefte, A., et al. (1996) Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis* 173, 240-245.



- Sinzger, C., Plachter, B., Stenglein, S., Jahn, G. (1993b). Immunohistochemical detection of viral antigens in smooth muscle, stromal, and epithelial cells from acute human cytomegalovirus gastritis. *J Infect Dis* 167 (6), 1427-32.
- Sodeik, B., Ebersold, M. et al. (1996). Mikrotubule and dynein mediated transport of incoming HSV – 1 capsids to the nucleus. *International Herpes Virus Workshop*, Netherlands. Poster Nr.174.
- Spaete, R.R., Gehrz, R.C., Landini, M.P. (1994). Human cytomegalovirus structural proteins. *J Gen Virol* 75 ( Pt 12), 3287-308.
- Stagno, S. (1995). Cytomegalovirus. In: Remington JS, Klein JO, eds. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 4th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders, 312-353.
- Stagno, S., Pass, R.F., Cloud, G., et al. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: incidence, transmission to fetus and clinical outcome. *JAMA* 256, 1904-1908.
- Stagno, S., Pass, R.F., Dworsky, M.E., Henderson, R.E., Moore, E.G., Walton, P.D., Alford, C.A. (1982). Congenital cytomegalovirus infection: The relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N Engl J Med* 306 (16), 945-9.
- Stagno, S., Reynolds, D.W., Huang, E.S., et al. (1977). Congenital cytomegalovirus infection: occurrence in an immune population. *N Engl J Med* 296, 1254-1258.
- Stagno, S., Reynolds, D.W., Pass, R.F. et al. (1980). Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 302, 1073-1076.
- Steven A.C., S.P.G. (1997). Herpes virus capsid assembly and envelopment. New York, N.Y., Oxford University Press.
- Stinski, M.F. (1983). *Molecular biology of cytomegaloviruses*. New York, Plenum Press.
- Stinski, M.F., Malone, C.L., Hermiston, T.W., Liu, B. (1991). Regulation of human cytomegalovirus transcription. In Wagner EK (ed). *Herpesvirus Transcription and its Control*. Boca Raton CRC Press, 245-260.
- Stinski, M.F., Mocarski, E., Thomsen, D. (1979). DNA of human cytomegalovirus: Size heterogeneity and defectiveness resulting from serial undiluted passage. *J Virol* 31 (1), 231-9.
- Stinski, M.F., Thomsen, D.R., Stenberg, R.M., et al. (1983). Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Virol* 46, 1-14.
- Story, C.M., Mikulska, J.E., Simister, N.E. (1994). A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *J Exp Med* 180 (6), 2377-81.

- Stromberg, K., Azizkhan, J.C., Speeg, K.V. Jr. (1978). Isolation of function human trophoblast cells and their partial characterization in primary cell culture. *Vitro* 14 (7), 631-8.
- Sunderland, C.A., Naiem, M., Mason, D.Y., Redman, C.W.G., Stirrat, G.M. (1981). The expression of major histocompatibility antigens by human chorionic villi. *J Repror Immunol* 3, 323.
- Takeda, A., Tuazon, C.U., Ennis, F.A. (1988). Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. *Science* 242 (4878), 580-3.
- Thiede, H.A. (1960). Studies of the human trophoblast in tissue culture. 1. Cultural methods and histochemical staining. *Am J Obstet Gynecol* 79, 636-47.
- Tóth, F.D., Mosborg-Petersen, P., Kiss, J., Aboagye-Mathiesen, G., et al. (1994). Antibody-dependent enhancement of HIV-1 infection in human term syncytiotrophoblast cells cultured in vitro. *Clin Exp Immunol* 96 (3), 389-94.
- Tóth, F.D., Szabó, B., Ujhelyi, E., Pálóczi, K., Horváth, A., Füst, G., Kiss, J., Bánhegyi, D., Hollán, S.R. (1991). Neutralizing and complement-dependent enhancing antibodies in different stages of HIV infection. *AIDS* 5 (3), 263-8.
- Tomiyama, T., Sugano, T., Tani, S., Hosoda, K., Matsumoto, Y. (1993). A microneutralization enzyme immunoassay for antibody to human cytomegalovirus. *J Immunol Methods* 26;159 (1-2), 71-9.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., Kern, H. (1993). Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 60 (1), 163-78.
- Truman, P., Ford, H.C. (1986). The effect of substrate and epidermal growth factor on human placental trophoblast cells in culture. *Vitro Cell Dev Biol* 22 (9), 525-8.
- Tugizov, S., Maidji, E., Pereira, L. (1996). Role of apical and basolateral membranes in replication of human cytomegalovirus in polarized retinal pigment epithelial cells. *J Gen Virol* 77 (Pt 1), 61-74.
- Tugizov, S., Maidji, E., Xiao, J., Zheng, Z., Pereira, L. (1998). Human cytomegalovirus glycoprotein b contains autonomous determinants for vectorial targeting to apical membranes of polarized epithelial cells. *J Virol* 72 (9), 7374-86.
- Urban, M., Britt, W., Mach, M. (1992). The dominant linear neutralizing antibody-binding site of glycoprotein gp86 of human cytomegalovirus is strain specific. *J Virol* 66 (3), 1303-11.
- Vettenranta, K., von Koskull, H., Heikinheimo, M., Raivio, K.O. (1986). Cytoskeletal markers and specific protein production in cells cultured from human first and third trimester placentae. *Vitro Cell Dev Biol* 22 (2), 100-6.
- Vornhagen, R., Hinderer, W., Sonneborn, H., Bein, G., Matter, L., The, T., Jahn, G., Plachter, B. (1995). The DNA-binding protein pul57 of human cytomegalovirus is a major target antigen for the immunoglobulin m antibody response during acute infection. *J Clin Microbiol* 33 (7), 1927-30.

- Wagner, B., Kropff, B., Kalbacher, H., Britt, W., Sundqvist, V.A., Ostberg, L., Mach, M. (1992). A continuous sequence of more than 70 amino acids is essential for antibody binding to the dominant antigenic site of glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J Virol* 66 (9), 5290-7.
- Waldman, W.J., Knight, D.A., Huang, E.H., Sedmak, D.D. (1995). Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in vitro model. *J Infect Dis* 171 (2), 263-72.
- Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., Riddell D.R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 333, 1038-44.
- Wathen, M.W., Stinski, M.F. (1982). Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J Virol* 41 (2), 462-77.
- Weber, B., Opp, M., Born, H.J., Langenbeck, U., Doerr, H.W. (1992). Laboratory diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection using polymerase chain reaction and shell vial culture. *Infection* 20 (3), 155-7.
- Weber K, Osborn M. (1982). Cytoskeleton: definition, structure and gene regulation. *Pathol Res Pract* 175 (2-3), 128-45.
- Wegmann, T.G., Lin, H., Guilbert, L., Mosmann, T.R. (1993). Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14 (7), 353-6.
- Weller, T.H., Hanshaw, J.B. (1962). Virologic and clinical observations on cytomegalic inclusion disease. *N Engl J Med* 266, 1233-1244.
- Whitley, R.J. (2004). Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. *Adv Exp Med Biol* 549, 155-160.
- Whitley, R.J., Cloud, G., Gruber, W., Storch, G.A., Demmler, G.J., Jacobs, R.F., et al. (1997). Ganciclovir treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of a phase II study. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 175 (5), 1080-6.
- Wiertz, E.J.H.J., Jones, T.R., Sun, L., et al. (1996). The Human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 84, 769-779.
- Wolf, D.G., Spector, S.A. (1993). Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma. *Transplantation* 56 (2), 330-4.
- Yeger, H., Lines, L.D., Wong, P.Y., Silver, M.M. (1989). Enzymatic isolation of human trophoblast and culture on various substrates: comparison of first trimester with term trophoblast. *Placenta* 10 (2), 137-51.
- Yui, J., Garcia-Lloret, M., Brown, A.J., Berdan, R.C., Morrish, D.W., Wegmann, T.G., Guilbert, L.J. (1994). Functional, long-term cultures of human term

trophoblasts purified by column-elimination of CD9 expressing cells. *Placenta* 15 (3), 231-46.

Zanghellini, F., Boppana, S.B., Emery, V., Griffiths, P. , Pass R.F. (1999). Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: Virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 180 (3), 702-7.

Zeitler, P., Markoff, E., Handwerger, S. (1983). Characterization of the synthesis and release of human placental lactogen and human chorionic gonadotropin by an enriched population of dispersed placental cells. *J Clin Endocrinol Metab* 57 (4), 812-8.

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. med. G. Jahn gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Dr. med. Stefan Stenglein danke ich für die Betreuung während des experimentellen Teils der Arbeit.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Maren Eggers für die hervorragende und zuverlässige Betreuung und die wertvolle Beratung beim Verfassen der Arbeit, die maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben.

Bei Frau Kathrin Eberhardt bedanke ich mich für die sachkundige Einweisung und die Mithilfe bei der Laborarbeit und für die außergewöhnlich freundliche Arbeitsatmosphäre.

Für die gute Vorarbeit, auf der diese Arbeit aufbauen konnte, möchte ich Frau Elke Schernikau sehr herzlich danken.

Den Mitarbeitern der Universitäts-Frauenklinik Tübingen danke ich für die gute Zusammenarbeit, die für die Verfügbarkeit und zeitgerechte Verarbeitung der Plazenten Voraussetzung war.

Für die Bereitstellung der Serumproben und der klinischen Daten bedanke ich mich bei Frau Prof. G. Enders.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders bei meinem Freund bedanken, die mich durch individuelle Hilfe und viel Verständnis jederzeit unterstützt haben.

## *Lebenslauf*

### *Persönliche Daten*

|                     |                           |
|---------------------|---------------------------|
| Name                | Sonja Michaela Geiger     |
| Geburtstag          | 16.07.1976                |
| Geburtsort          | Stuttgart                 |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                   |
| Eltern              | Gabriele und Horst Geiger |

### *Schulbildung*

|             |  |
|-------------|--|
| 1983 – 1987 | Grundschule, Stuttgart-Rohr  |
| 1987 – 1996 | Hegel-Gymnasium, Stuttgart-Vaihingen<br>Abschluss: Hochschulreife (Note 1,4) |

### *Hochschulbildung*

|             |  |
|-------------|--|
| 1996 – 1998 | Vorklinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen              |
| 1998 – 2003 | Klinisches Studium an der Universität Tübingen                                 |
| 1998 – 1999 | Wissenschaftliche Hilfskraft am Anatomischen Institut der Universität Tübingen |
| 2000        | Studienaufenthalt in Valparaiso, Indiana (USA)                                 |
| 2002 – 2003 | Praktisches Jahr in Visp (Schweiz) und Stuttgart                               |
| 13.05.2003  | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)                            |

### *Berufliche Tätigkeit*

|             |   |
|-------------|---|
| seit 2/2004 | Assistenzärztin am Zentrum für Innere Medizin des Katharinenhospitals, Klinikum Stuttgart |
|-------------|---|