



Etablierung und Charakterisierung eines dreidimensionalen Zellkulturmodells für Kuhpockeninfektionen

vorgelegt von Diplom-Ingenieur Robert Koban aus Berlin

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften - Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Hajo Haase Gutachter: Prof. Dr. Roland Lauster Gutachter: Dr. Heinz Ellerbrok Gutachter: Prof. Dr. Jens Kurreck

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. November 2017

Berlin 2017

Zusammenfassung

Zusammenfassung

Zellkultivierungen stellen ein elementares Werkzeug für die Erforschung vielfältiger biologischer Phänomene dar. In der Virologie werden Infektionen in vitro fast ausschließlich in Monolayer-Kulturen charakterisiert und erforscht, in denen Zellen flach ausgebreitet auf starren Oberflächen kultiviert werden und im Vergleich zum in vivo Status der gleichen Zellen deutliche Unterschiede bezüglich Morphologie und Physiologie aufweisen. Im Gegensatz dazu werden in einigen Teilen von Forschungsfeldern wie der Onkologie und der Stammzellforschung, aber auch für spezielle virale Erreger, deren Bedürfnisse keine andere Art der Kultivierung zulassen, bereits seit Jahrzehnten alternative Kultivierungsmethoden verwendet. Bei diesen Alternativen handelt es sich um dreidimensionale (3D) Gewebekulturen, in denen Zellen in vivo-ähnliche Charakteristika aufweisen und somit ein sehr gutes Abbild des jeweiligen Gewebes und untersuchten biologischen Phänomens liefern. Für Infektionen mit Orthopockenviren (OPV), deren Analyse aufgrund des zoonotischen Potentials einiger Vertreter wie den Kuhpockenviren (CPXV) einerseits und der Bedrohung eines Missbrauchs als bioterroristisches Agens des humanpathogenen Variola Virus andererseits, von hoher Relevanz für die öffentliche Gesundheit ist, wurden bis dato nur wenige Untersuchungen in 3D-Kulturmodellen publiziert. Diese beschränkten sich hauptsächlich auf morphologische Charakterisierungen und die Analyse der Wirksamkeit verschiedener antiviraler Substanzen.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines 3D-Zellkulturmodells, das einerseits zur weiterführenden Erforschung von OPV Infektionen beitragen sollte und andererseits einfacher zu handhaben und an ein breiteres Spektrum möglicher Wirtszellen adaptierbar sein sollte als bisher etablierte 3D-Ansätze. Zu diesem Zweck wurde als Fundament für die 3D-Kulturen eine dezellularisierte biologische extrazelluläre Matrix (EZM) verwendet, die mit verschiedenen Zelltypen besiedelt werden konnte und somit für die Untersuchung unterschiedlicher Viren geeignet war. Uninfizierte epitheliale 3D-Zellkulturen wiesen im Vergleich zu korrespondierenden Monolayer-Kulturen distinkte Unterschiede bezüglich Zellmorphologie, Differenzierungsstatus sowie Polarisation auf und zeigten auf Transkriptomebene ein ähnliches Expressionsmuster wie ihr *in vivo* Gegenstück – die menschliche Epidermis. Um detailliertere Erkenntnisse über die Virusreplikation von OPV und deren Interaktionen mit den Wirtszellen innerhalb eines komplexen biologischen Systems zu erhalten, wurden zwei epitheliale 3D-Infektionsmodelle mit dem CPXV-Stamm Brighton Red (BR) als Modellvirus etabliert.

L

Zusammenfassung

Durch die 3D-Kultivierung der Zelllinie Vero E6 konnte bei einer Infektion mit CPXV eine im Vergleich zur Monolayer-Kultur deutlich verlängerte Zellviabilität bei annähernd gleichbleibenden Virustitern erzielt werden. Weiterhin war in diesem Modell, wie auch bei der Weiterentwicklung der 3D-Kulturen mit primären humanen Keratinozyten, eine effektivere Virusreifung in Zelllysaten und Überständen zu erreichen. Während die Virusreplikation in 3D- und Monolayer-Kultur ansonsten sehr ähnlich ablief, gab es in primären 3D-Kulturen erhebliche Unterschiede im Wirtszelltranskriptom, die sich signifikant auf die Regulation spezifischer biologischer Prozesse auswirkten. Zudem konnte durch die Inhibition des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors, der sich anhand von Vorergebnissen und früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe als vielversprechendes Ziel für eine antivirale Therapie mit Gefitinib anbot, erstmals gezeigt werden, dass eine Virusinfektion in Abhängigkeit der Kultivierungsart in 3D-kultivierten Zellen wesentlich effizienter gehemmt werden kann als in korrespondierenden Monolayer-Kulturen.

Das in dieser Arbeit etablierte Kultivierungsmodell stellt ein vielfältig einsetzbares, reproduzierbares und im Vergleich zu komplexeren 3D-Ansätzen einfacher zu handhabendes 3D-Zellkulturmodell für Zelllinien und Primärzellen dar. Durch das gewebeähnliche Verhalten der Zellen können *in vitro* prädiktivere Daten für das Geschehen *in vivo* generiert und mögliche Zielmoleküle für antivirale Substanzen ermittelt werden, die in konventionellen Monolayer-Kulturen aufgrund des artifiziellen Wachstums der Zellen unter Umständen nicht von Relevanz sind. Andersherum trägt die 3D-Kultivierung auch dazu bei, die mitunter langwierige Erforschung von Zielmolekülen zu vermeiden, die durch Versuche in Monolayer-Kulturen identifiziert werden und unter Umständen lediglich kultivierungsabhängige Artefakte darstellen. Aufgrund der besseren Vorhersage der Wirkungsweise von Substanzen *in vivo* können so eventuell notwendige Tierversuche präziser geplant und auf ein Minimum reduziert werden und somit nur noch die aussichtsreichsten Kandidaten in weiterführende, kostenintensive klinische Studien überführt werden.

II

Summary

Summary

Cell cultivations reflect a fundamental tool for research on diverse biological phenomena. Research on viruses *in vitro* is mainly carried out in conventional monolayer cultures where cells grow outstretched and flattened on rigid surfaces. Compared to *in vivo* conditions monolayer cultured cells show distinct differences in morphology and physiology. Unlike in virology, three-dimensional cell cultivation methods are used in different fields of research such as oncology or stem cell research since several decades because of their *in vivo* like characteristics and therefore high similarity to the respective organs or investigated biological phenomena. But also a few viruses whose biological needs are linked to more complex and differentiated tissues are studied in 3D cultures since more than twenty years. So far, infections with orthopoxviruses (OPV) which are highly relevant for public health because the zoonotic potential of some species such as cowpox virus (CPXV) as well as the threat of Variola virus being misused as a biological weapon were rarely studied in 3D culture models. The few existing studies were limited to morphological characterizations and some efficacy studies of antiviral substances.

Therefore, the aim of the study was on the one hand the establishment of an easy-to-handle 3D cell culture model for comprehensive investigations of OPV infections. Further, the 3D culture system should allow adaption to a broad spectrum of cells for the study of different viruses. For this reason, a decellularized biological extracellular matrix (ECM) was used to generate 3D cultures with several cell types. Uninfected epithelial 3D cultures showed distinct differences regarding cell morphology, differentiation, and polarization compared to the corresponding monolayer cultures. Their gene expression patterns exhibited strong similarities to their *in vivo* counterparts – the human epidermis. For more detailed analysis of OPV replication and virus-host cell interactions within a complex biological system two epithelial 3D infection models with CPXV Brighton Red (BR) as model virus were established.

Cell viability in CPXV-infected 3D cultures established with the Vero E6 cell line was distinctly prolonged compared to the corresponding monolayer cultures producing nearly stable viral titers. In this infection model as well as in an advanced 3D culture system with primary human keratinocytes efficiency of virus maturation in cell lysates and in supernatants was strongly elevated. However, while overall virus replication in 3D and monolayer cultures was comparable, considerable differences in the host cell transcriptome were observed which resulted in a significant differential regulation of specific biological processes.

III

Summary

Based on the data from the 3D culture and on data from previous studies of our working group, the epidermal growth factor receptor emerged as a promising target for a host-directed antiviral therapy that could be specifically inhibited by gefitinib. With this approach it was shown for the first time that virus inhibition was cell culture model dependent with a strongly enhanced efficiency in 3D cultures.

In summary, this versatile and reproducible 3D culture system for cell lines and primary human cells is far easier to handle than many previously established 3D approaches. Due to the tissue-like behavior of the cells, data generated *in vitro* will be more predictive for the *in vivo* situation. Therefore, 3D cultivation allows the discovery of novel target molecules for antiviral treatment otherwise missed due the artificial nature of conventional monolayer cultivation. Vice versa, 3D cultivation may help reducing potential lengthy and expensive research on target molecules only identified as cultivation artefacts in monolayer cultures. Due to an improved prediction of the *in vivo* mechanisms of substances based on 3D cultivation, animal experiments can be planned more precisely and therefore ultimately could be reduced to a minimum. In consequence, only the most promising candidate substances would finally reach the cost-intensive clinical trials.

Inhaltsverzeichnis

Titelblatt	I
Zusammenfassung	I
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Pockenviren	1
1.1.1. Taxonomie und Aufbau	1
1.1.2. Geschichte und Bedeutung	1
1.1.3. Replikation und Reifung	3
1.1.4. Kuhpockenviren	6
1.1.5. Antivirale Therapien gegen Pockeninfektionen	7
1.2. 3D-Zellkultivierung	10
1.2.1. Monolayer- vs. 3D-Kultivierung	10
1.2.2. Möglichkeiten der 3D-Kultivierung	12
1.2.3. 3D-Kultivierung in der Virologie	17
1.3. Matrix der Auto Tissue Berlin GmbH	22
1.3.1. physiologischer Kontext	22
1.3.2. Dezellularisierungsprozess und Resultat	22
1.3.3. Verwendung in der Chirurgie	23
1.4. Zielstellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1. Geräte	25
2.2. Enzyme	25
2.3. Verbrauchsmaterialien	26
2.4. Molekularbiologische Kits	26
2.5. Reagenzien	27
2.6. qPCR Assays	28
2.7. Eukaryotische Zellen und Zellkulturmedien	28
2.8. Sonstige biologische Agenzien	29
2.9. Antikörper	29
2.10. Software	30
2.11. Puffer und Lösungen	30
2.12. Zytologische Methoden	31
2.12.1. Zellen passagieren in Monolayer-Kultur	31
2.12.2. Zellen zählen und aussäen für Monolayer-Kultivierung	31
2.12.3. Zellen auftauen und einfrieren	32
2.12.4. Präparation der Matrix für 3D-Kultivierungen	32
2.12.5. Vorinkubation und Repopulation der Matrix für 3D-Kultivierungen	32
2.12.6. Zellkultivierung der 3D-Präparate in Polystyrenplatten	33
2.12.7. Zellkultivierung der 3D-Präparate auf Ultra Low Attachement Plates (ULAP)	34

Inhaltsverzeichnis

2.12.8. Zellkultivierung auf Kollagen I-beschichteten Zellkulturplatten	34
2.13. Virologische Methoden	34
2.13.1. Virusanzucht	34
2.13.2. Virusaufreinigung	34
2.13.3. Plaquetitrationsassay	35
2.13.4. Quantifizierung viraler DNA	35
2.13.5. Infektion von Monolayer-Kulturen für Versuche	35
2.13.6. Infektion von 3D Kulturen für Versuche	36
2.14. Nukleinsäure-Präparation	36
2.14.1. DNA-Extraktion aus Überständen	36
2.14.2. DNA/RNA-Extraktion aus Zelllysaten	36
2.14.3. DNase-Verdau	37
2.14.4. cDNA-Synthese	37
2.14.5. Konzentrationsbestimmung gelöster Nukleinsäuren	38
2.14.6. Bestimmung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer	38
2.15. Nukleinsäure-Analytik	38
2.15.1. Design von PCR/qPCR-Assays	38
2.15.2. Herstellung von qPCR Standards	39
2.15.3. qPCR mit TaqMan-Sonden	40
2.16. Proteinbiochemische Methoden	41
2.16.1. Aufarbeitung von RIPA-Proben	41
2.16.2. Protein-Quantifizierung mittels Tryptophan-Bestimmung	42
2.16.3. denaturierende SDS-PAGE	42
2.16.4. Semi-dry Western Blot	42
2.16.5. Immunologische Färbung	43
2.16.6. Strippen der Membran	43
2.17. Histologische Methoden	43
2.17.1. Probenpräparation für IHC	43
2.17.2. Herstellung von Kryoschnitten	44
2.17.3. Immunhistochemische Färbung (IHC) von Gewebeschnitten	45
2.17.4. Immunfluoreszenzassay (IFA) von 2D-Präparaten	45
2.17.5. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von IHC- und IFA-Präparaten	45
2.17.6. Erstellung von digitalen vertikalen Schnitten mittels cLSM	46
2.17.7. Transmissions-Elektronenmikroskopie	46
2.18. Transkriptomanalyse mittels NGS	47
2.18.1. Probenvorbereitung	47
2.18.2. NGS mittels HiSeq Plattform	47
2.18.3. Daten Prozessierung mit Partek Flow	47
2.18.4. GO-Term Analysen mit Cytoscape (BiNGO-Tool)	49
2.18.5. Analyse hierarchischer Cluster mit CIMminer	49
2.19. Zellbasierter Viabilitätsassay: CellTiter-Glo [®] (Promega)	50

VII	
10. Appendix	146
9. Literaturverzeichnis	134
8. Tabellenverzeichnis	. 133
7. Abbildungsverzeichnis	131
6. Abkürzungsverzeichnis	130
5. Danksagungen	129
4.4. Fazit und Ausblick	. 127
4.3.8. Differentielle Sensitivität gegenüber antiviralen Substanzen	. 125
4.3.7. Differentielle Expression von Wirtszellproteinen	. 121
4.3.6. Differentielle Expression von Wirtszellgenen	. 117
4.3.5. Finfluss auf die Zellviahilität	115
4.3.4 Mornhologische Veränderungen der Zellen	111
4.3.3. Virusweitergabe auf uninfizierte Zellen	112
4.3.2 Virusreifung und Infektiosität	111
4.3.1 Infizierbarkeit und Virusrenlikation	110
4.3 Finfluss der Kultivierungsmethode auf die Infektion	102
4.2.5. Langzeitkultivierbarker	104
4.2.2. i olarisation	104
4.2.2. Polarisation	102
4.2.1. Tellmornhologie	101
4.1. Lignung der dezendransierten extrazendraten Perikarumatrix als Fundament für 3D-Zellkulturen	99
4. 1. Fignung der dezellularisierten extrazellulären Derikardmatriv als Eundament für 2D. Zellkulturen	99
A Diskussion	93
3.6.2. Vergleich mit weniger komplexen Zellkulturmethoden: Kollagon L. Boschichtung	90
3.6.1. Vergleich mit kompleveren 3D-Modellen: Raft-Kulturen der Haut	00
3.6. Vergleich der 3D-Kultivierung mit alternativen Kultivierungsmethoden	۵0
3.5. Antivirale Theranie mit dem EGER-Inhibitor Gefitinih	88
3.4.4. Übertragung der Transkriptomdaten auf weitere Infektionszeitnunkte und Zelltypen	83
3.4.3. Vergleich der Transkriptomanalysen	
3.4.2. Charakterisierung von Primärinfektionen von CPXV in NHEK	78
3.4.1. Charakterisierung von Sekundärinfektionen von CPXV in NHEK	72
3.4. Analysen auf Transkriptomebene	72
3.3.2. Infektion von primären humanen Zellen (NHFK)	66
3.3.1. Infektion von Zelllinien (Vero E6)	61
3.3. Charakterisierung der Infektion mit Kuhpockenviren	61
3.2.2. Dynamische Betrachtung	54
3.2.1. Statische Betrachtung	54
3.2. Renonulation der dezellularisierten FZM	JZ
2.1. Charakterisionung der extrazellulären Derikard Matrix	JZ
2.20. Hemmstoffversuche mit Gefitinib	50
2.20 Hommetoffyorsucha mit Gafitinih	50

1. Einleitung

1.1. Pockenviren

1.1.1. Taxonomie und Aufbau

Bei den Poxviridae (Pockenviren) handelt es sich um eine Virusfamilie, die eine große Anzahl verschiedener Virusspezies umfasst, welche Säugetiere, Vögel und Insekten infizieren. Sie werden in zwei Unterfamilien eingeteilt. Die *Chordopoxvirinae* umfassen die Pockenviren der Wirbeltiere und die *Entomopoxvirinae* diejenigen der Insekten [1]. Erstere unterteilen sich in zehn Genera, wobei sich die Vertreter eines Genus genetisch, serologisch und bezüglich Morphologie und Wirtstropismus ähneln [2]. Pockenviren mit humanpathogenem Potential finden sich in den Genera der Orthopox-, Molluscipox-, Parapox- und Yatapoxviren [3].

Die Virionen besitzen eine rechteckige bis ovale Form und eine Größe von 200 bis 400 nm [2]. Das virale Genom liegt im Kern der Virionen als doppelsträngige DNA mit einer je nach Genus und Stamm variierenden Länge von ca. 130-375 kbp vor und kodiert für ca. 130-260 offene Leserahmen (ORF) [4]. Im zentralen Teil des Genoms (ca. 100 kbp) sind zumeist hochgradig konservierte Sequenzen lokalisiert, während die ORFs der terminalen Regionen variable Sequenzen beherbergen [5]. Neben den Nukleinsäuren sind im Viruskern verschiedene virale Proteine lokalisiert, die vor allem für die Initiation der viralen Transkription von Bedeutung sind. Die Virionen bestehen weiterhin aus zwei Lateralkörpern, die Enzyme für die wirtsunabhängige, virale Replikation enthalten und je nach Virionenform eine oder mehrere Lipidmembranen [2].

1.1.2. Geschichte und Bedeutung

Der bedeutendste Vertreter der Poxviridae ist das Variola Virus (VARV), welches der Erreger der humanen Pocken (*smallpox*) ist. Diese gehört zu den ältesten bekannten Infektionskrankheiten des Menschen und führte allein im 20. Jahrhundert regelmäßig weltweit verbreitet zu Epidemien mit etwa 400 Millionen Todesopfern [6].

Als wirksame jedoch sehr gefährliche Prophylaxe gegen die Pockenerkrankung ist seit mehr als tausend Jahren die Variolation bekannt, bei der eingetrocknete Pockenkrusten von vormals Erkrankten verrieben und dann geschnupft oder in die Haut geritzt (Skarifikation) wurden [7]. Erst im Jahr 1796 etablierte Edward Jenner mit der sogenannten Vakzination eine weit weniger riskante Methode zur effektiven Verhütung der Pocken. Er infizierte einen Knecht mit einem Variola verwandten, von der Kuh stammenden Pockenvirus.

Nach dem Abklingen der relativ leichten Krankheitssymptomatik infizierte Jenner den Knecht mit den echten Pocken zur Bestätigung der erfolgreichen Immunisierung. Der Proband überlebte diese Infektion und zeigte Jenners Bericht nach bis auf eine lokale Hautreaktion und anschließende Vernarbung dieser Stelle keine weiteren pockentypischen Symptome. Der Vorgang dieser Vakzination gilt als Grundlage für alle heute verwendeten Impfungen gegen Erreger von Infektionskrankheiten [8]. Während Edward Jenner für die ersten Immunisierungen das Kuhpockenvirus (CPXV) verwendete, wurden in der Folge auf der ganzen Erde parallel Kuhpocken und Pferdepocken (HSPV) zu Immunisierungszwecken in verschiedenen Tieren passagiert [9]. Zu einem bestimmten Zeitpunkt wurden diese beiden Viren durch das Vaccinia Virus (VACV) als allgemein eingesetztes Impfvirus ersetzt, welches sich mutmaßlich u. a. aus einem HSPV-ähnlichen Vorläufer heraus entwickelt hat [10, 11].

Die Durchimpfungsrate in der Weltbevölkerung war trotz der global eingesetzten Vakzine bis weit in das 20. Jahrhundert ungenügend, sodass die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) im Jahr 1958 aufgrund der zahlreichen pockenbedingten Todesopfer ein weltweites Impfprogramm mit dem Ziel der vollständigen Ausrottung des VARV initiierte [12]. Infolgedessen trat im Jahr 1977 in Somalia die letzte natürliche humane Pockenerkrankung auf, so dass die humanen Pocken 1980 von der WHO für ausgerottet erklärt werden konnten [13]. Die dauerhafte Ausrottung war nur deshalb erfolgreich, weil das Variola Virus bis auf den Menschen keinen natürlichen Wirt besitzt und außerhalb eines Organismus nur für kurze Zeit stabil persistieren kann. Aufgrund eines ungünstigen Risiko-Nutzen-Profils wurden nach erfolgreicher Eradikation die Pockenimpfungen in den frühen 80er Jahren eingestellt [14]. Wegen der somit stetig sinkenden Immunisierungsrate in der Bevölkerung gegen Pockenviren kommt VARV vor allem mit Hinblick auf bioterroristisches Gefährdungspotential bei gezielter Freisetzung eine immer größere Bedeutung zu [15]. VARV wurde von der CDC in die Kategorie A der Bioterror-relevanten Agenzien eingestuft. Die Klassifizierung erfolgte aufgrund der hohen Mortalität, der leichten Übertragbarkeit des Virus, der mangelnden Therapiemöglichkeiten im Falle einer Erkrankung und der abnehmenden Immunität in der Bevölkerung [16].

Potentielle Infektionsquellen wie Pockenbestände von Forschungseinrichtungen wurden über die Jahre sukzessiv vernichtet, so dass derzeitig (Stand 09/2017) nur noch Variola-Stammsammlungen im *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, USA) und dem *State Research Centre for Virology and Biotechnology* (VECTOR, Koltsovo, Russische Föderation) unter Kontrolle der WHO gehalten werden [17].

Die endgültige Vernichtung dieser VARV-Rückstellungen wird seit Jahren diskutiert und geriet kürzlich verstärkt in den Fokus, da kanadischen Forschern die komplett synthetische Herstellung von infektiösen Orthopockenviren gelang [18, 19]. Hierbei handelte es sich um das eigentlich ausgerottete Pferdepockenvirus, wobei der Syntheseweg prinzipiell auf alle OPV inklusive VARV übertragbar wäre. Darüber hinaus lässt sich auch die Pathogenität von wenig pathogenen OPV durch heterologe Einbringung von Fremdgenen steigern, wie es bereits für Mauspockenviren gezeigt werden konnte [20]. Eine bioterroristische Gefahr geht somit nicht mehr nur von den zurückgehaltenen VARV aus und es ist somit fraglich, ob und in welchem Umfang die Vernichtung der letzten Bestände zur Verhütung potenzieller Anschläge beitragen könnte.

Ein weiteres Risiko von Pockenviren geht mit der Übertragung tierpathogener Pockenviren auf den Menschen einher. Bedeutende Vertreter dieser Zoonoseerreger unter den Orthopockenviren sind neben den Affen-, Büffel- und Kamelpocken, die in Teilen Afrikas und Asiens endemisch sind, auch das Vaccinia Virus (Südamerika) und das Kuhpockenvirus, welches regelmäßig zu Erkrankungen beim Menschen mit zum Teil schweren Symptomatiken in Mitteleuropa führt [21-25].



Abb. 1: Endemiegebiete von humanpathogenen Orthopockenviren weltweit. Dargestellt sind die Gebiete, in denen regelmäßig humane Infektionen mit den jeweils aufgeführten Vertretern der OPV diagnostiziert wurden und bei denen es sich nicht nachweislich um importierte Erkrankungen handelte.

1.1.3. Replikation und Reifung

Die Replikation von Orthopockenviren (OPV) wurde vor allem am Beispiel des VACV erforscht. Am Ende des komplexen Replikationszyklus stehen zwei verschiedene infektiöse Virionenformen. Dies sind zum einen die reifen Virionen (*mature virions* – MV) und zum anderen die umhüllten Virionen (*enveloped virions* – EV), die um den MV-"Kern" eine weitere Lipidmembran tragen [2].

Entsprechend tragen die beiden Virionenformen auf den äußeren Membranen auch verschiedene virale Oberflächenproteine, von denen einige als Rezeptoren für neutralisierende Antikörper gegen Pockenviren dienen. EVs treten häufig Zell-assoziiert auf und können durch Induktion von Aktinfilamenten auf Nachbarzellen übertragen werden [26]. Sie können aber auch über Abgabe in Körperflüssigkeiten zwischen verschiedenen Geweben innerhalb eines Organismus weitergegeben werden. MVs sind dagegen mutmaßlich für die Wirt-zu-Wirt Transmission verantwortlich und werden nach Zelllyse freigesetzt [27].

Die Infektion wird mit der Adsorption der Viruspartikel an die Oberfläche der Wirtszelle initiiert, wobei die unterschiedlichen Virionenformen verschiedene Rezeptoren nutzen. Während MVs über vier Verbundproteine an Glykosaminoglykane oder Laminin binden, sind die Rezeptoren für EVs weiterhin unbekannt [28]. Durch die Nutzung ubiquitär vorhandener Bindungsmoleküle sowie verschiedener Adhäsionsmechanismen besitzen OPV einen breiten Zelltropismus. Der Host-Range ist zudem hauptsächlich durch intrazelluläre Ereignisse nach dem Viruseintritt in die Zelle bestimmt und weniger durch spezifische Rezeptoren [29]. Adhärierte Viruspartikel gelangen über Fusion mit der Zytoplasmamembran oder über Makropinozytose und anschließende Fusion mit der Endosomenmembran in das Zytoplasma der Wirtszelle, in der dann der virale Replikationszyklus durchlaufen wird [28]. Dieser erfolgt in sogenannten Virusfabriken, die sich mit Beginn der DNA-Replikation bilden und mit der Virusmorphogenese wieder auflösen [30]. Die Replikation ist gekennzeichnet durch die Bildung früher, intermediärer und später Virusgenprodukte, wobei die frühe Genexpression noch im intakten Viruskern durch in den Kern verpackte virale Enzyme induziert wird und etwa die Hälfte aller Transkripte umfasst, die durch das Virus kodiert werden [31, 32]. Die frühe Genexpression ist ab etwa 20 min p.i. detektierbar und erreicht nach ein bis zwei Stunden ihr Maximum. Die Expression der intermediären Gene beginnt nach Freisetzung des Virusgenoms in das Zytoplasma und erfolgter Replikation durch frühe virale Proteine. Sie kodieren u. a. für regulatorische Proteine, die die Expression der späten viralen Gene induzieren. Bei den späten Genen handelt es sich hauptsächlich um Strukturproteine und jene Enzyme, die zum Zweck der frühen viralen Genexpressionsinduktion in den Viruskern verpackt werden. Für die intermediäre und späte virale Genexpression sind auch Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle notwendig. Die intermediären Gene werden nach ca. 1,5 bis 2 h p.i. exprimiert, die späte Genexpression beginnt nach etwa 2 h und kann bis 24 h p.i. anhalten [2]. Pro Zelle werden etwa 10.000 virale Genomäquivalente (GE) gebildet, von denen je nach Zelltyp bis zu 50 % in Viruspartikel verpackt werden [2].

Diese Assemblierung der einzelnen Viruskomponenten erfolgt über die Bildung von sichelförmigen Membranfragmenten (*crescents*), die sich vom glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) ableiten bis hin zu geschlossenen sphärischen Vesikeln (MVs), die über Mikrotubuli durch die Zelle transportiert werden.

In der Peripherie der Wirtszelle erfolgt dann für einen Teil der MVs die Umhüllung mit zwei weiteren Membranen, die vom trans-Golgi-Netzwerk stammen [33]. Die resultierenden IEVs (*intracellular enveloped virion*) werden wieder über Mikrotubuli zur Zytoplasmamembran transportiert, mit der die äußere Membran der IEVs fusioniert. Die ausgeschleusten EVs besitzen letztlich noch zwei Membranen und werden entweder in das Medium freigesetzt oder verbleiben über zelluläre Aktinfilamente assoziiert mit der Zytoplasmamembran als CEVs (*cell-associated enveloped virion*) [27].



Abb. 2: Replikationszyklus von OPV und Ansatzpunkte für antivirale Therapien (nach [34]). Schematischer Ablauf der OPV Infektion beginnend mit dem Viruseintritt gefolgt von der Virusreplikation, den verschiedenen Gen- und Proteinexpressionsphasen bis hin zum Viruszusammenbau und den unterschiedlichen Arten der Freisetzung infektiöser Partikel. Weiterhin sind die möglichen Ansatzpunkte für antivirale Therapien gegen OPV aufgezeigt und die Substanzen oder Methoden, mit denen bereits veröffentlichte Versuche durchgeführt wurden. CEV: *cell-associated enveloped virion;* CGF: *cowpox growth factor;* EGFR: *epidermal growth factor receptor;* EV: *enveloped virion;* IEV: *intracellular enveloped virion;* WC: *mature virion;* VIG: Vaccinia Immunglobulin.

1.1.4. Kuhpockenviren

Das Kuhpockenvirus (*cowpox virus*, CPXV) besitzt das breiteste Wirtsspektrum aller OPV und wird von Nagetieren und vor allem von Katzen, die als das natürliche Reservoir der CPXV gelten, regelmäßig auf den Menschen übertragen [35]. Unter allen OPV verursachen die CPXV die häufigsten zoonotischen Infektionen in Europa, eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde bisher (Stand: 09/2017) jedoch noch nicht beschrieben [25]. Es wurden auch andere Wildtiere und domestizierte Tiere als Quellen für Zoonosen identifiziert [36].

Infektionen mit dem Kuhpockenvirus verursachen beim Menschen in den meisten Fällen lokale Hautläsionen und sind in der Regel selbstlimitierend [36]. Bei Immunsupprimierten sind auch generalisierte Infektionen möglich, die zum Tode führen können [37]. Die Schwere und Ausprägung der Erkrankung ist abhängig von der Dosis, dem Übertragungsweg und vor allem dem jeweiligen Kuhpockenstamm [38]. Unter allen OPV besitzen CPXV die größte genetische Diversität, sodass sie streng genommen keine phylogenetische Einheit, sondern eine Gruppierung verschiedener OPV Spezies darstellen [39]. CPXV kodieren unter allen OPV für die höchste Zahl viraler Gene. Das CPXV Genom umfasst zudem viele Gene des VARV, für den Menschen sind jedoch keine hochpathogenen Stämme bekannt [40]. Es wird zudem vermutet, dass VARV aus einem zoonotischen Erreger wie den CPXV hervorgegangen ist und durch wenige Mutationen an den Menschen adaptiert wurde [41]. Zwar besteht gegen verschiedene OPV eine Kreuzimmunität, durch die Einstellung der Pockenimpfungen in den 80er Jahren sinkt jedoch die Protektion in der Bevölkerung, wodurch die Immunität gegenüber zoonotischen Pockeninfektionen ebenfalls zurückgeht und somit die Gefahr von Infektionen stetig steigt [42]. Es konnten zeitliche und regionale Kozirkulationen von verschiedenen Kuhpockenstämmen in Deutschland beschrieben werden [43].

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kuhpockenstamm Brighton Red (CPXV BR) handelt es sich um ein humanes Isolat, welches seit Jahrzehnten in der Pockenforschung verwendet wird und als Referenzstamm für Charakterisierungen von Kuhpockenisolaten dient. Es wurde in einem nichthumanen Primatenmodell (NHP) als repräsentatives Infektionsmodell für VARV Infektionen im Menschen etabliert, mit dem die unterschiedlichen Infektionswege von VARV und deren charakteristische Krankheitsverläufe nachgebildet werden konnten [44].



Abb. 3: Beispiele von epidermalen Kuhpocken-Läsionen in verschiedenen Spezies. Schwerwiegende CPXV Läsion am Kinn eines Menschen (A), der mit dem gleichen Isolat wie ein Mungo infiziert war, bei dem Läsionen über den ganzen Kopf verteilt waren (B). Typische Ausprägung von Läsionen am Kopf einer Hauskatze (C) und am Kopf und den Extremitäten einer Ratte während einer generalisierten CPXV Infektion (D) [38, 45, 46].

1.1.5. Antivirale Therapien gegen Pockeninfektionen

Aufgrund der bestehenden Bedrohung einer gewollten Ausbringung von VARV als bioterroristisches Agens und wegen des weltweit zunehmenden Auftretens von teils schwerwiegenden zoonotischen Infektionen mit verschiedenen OPV Spezies, gewinnen Pockenvirusinfektionen immer mehr an Relevanz für die öffentliche Gesundheit [29]. Daher wurden in jüngster Vergangenheit eine Reihe von antiviralen Therapie- und Prophylaxeansätzen erforscht, deren Wirkmechanismen und Wirksamkeit im Folgenden beschrieben und in Abb. 2 dargestellt sind. Die Auflistung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und soll lediglich einen Überblick über die Diversität der vielversprechendsten Ansätze liefern.

a) Inhibition des Viruseintritts: CPP EB

Das Peptid EB gehört zu der Gruppe sogenannter zellpenetrierender Peptide (CPP) und konnte als Transporter für DNA, Proteine und andere Moleküle in das Zytoplasma von Zielzellen beschrieben werden [47]. EB besteht aus der Signalsequenz des humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF-4 und einem zusätzlichen "Tag" zur verbesserten Löslichkeit [48]. Eingesetzt als antiviraler Wirkstoff konnte durch EB *in vitro* die Penetration von HeLa-Zellen durch VACV signifikant inhibiert werden. Da die Virusadsorption jedoch gleichzeitig unverändert gegenüber den Kontrollen blieb, wurde von den Autoren eine Inhibition der Membranfusion geschlussfolgert [49].

b) Inhibition der Transkription: Nigericin

Nigericin ist ein Ionophor, das in die Zellmembran eingebaut wird und den Austausch monovalenter Ionen fördert [50]. Neben der Wirksamkeit gegen Polio- und Influenzaviren konnte auch eine annähernd vollständige Inhibition der VACV Replikation *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei wirkt Nigericin im niedrigen nanomolaren Bereich vor allem auf die frühe virale Genexpression und die Replikation, wodurch nachfolgend auch die weiteren Genexpressionsphasen kompromittiert werden. Der Viruseintritt in die Zelle bleibt gleichzeitig unbeeinflusst [51].

c) Inhibition der Replikation: Cidofovir, Brincidofovir, Ribavirin

Das azyklische Nukleotidanalogon Cidofovir (CDV) besitzt eine breite Wirksamkeit gegen verschiedene DNA-Viren, darunter Pockenviren der Genera Ortho-, Para- und Molluscipoxvirus [52]. Die antivirale Wirksamkeit resultiert aus der Inhibition der viralen DNA Polymerase und somit der Virusreplikation [53]. CDV ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wirksam, verursacht allerdings z.T. schwere nephrotoxische Nebenwirkungen und weist eine schlechte orale Verfügbarkeit auf [54]. Zudem wurden bereits resistente OPV Stämme identifiziert [55].

Aufgrund dieser Limitationen wurde Brincidofovir (BCV) designt, bei dem es sich um ein Derivat von CDV handelt, welches den gleichen antiviralen Wirkmechanismus wie CDV besitzt [56]. BCV weist jedoch keine Nephrotoxizität und eine bessere orale Verfügbarkeit als CDV auf und hat zudem eine deutlich geringere mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) gegen Pockenvirusinfektionen [57].

Einen ähnlichen Wirkmechanimus, der jedoch zumindest für DNA Viren nicht komplett aufgeklärt werden konnte, besitzt das kleine Molekül Ribavirin, was bereits bei einer Vielzahl verschiedener Virusinfektionen als antivirale Substanz erfolgreich eingesetzt wurde [58]. Auch für VACV Infektionen konnte die Wirksamkeit *in vivo* nachgewiesen werden [59].

d) Inhibition der Translation: RNA Interferenz

Durch RNA Interferenz mittels *small interfering* RNAs (siRNAs) konnten in jüngster Vergangenheit für eine Vielzahl von Virusinfektionen *in vitro* und *in vivo* vielversprechende antivirale Strategien entwickelt werden [60]. Durch siRNAs können gezielt spezifische virale mRNAs aufgrund komplementärer Basenpaarungen gebunden und im Folgenden innerhalb eines Protein-/ RNA-Komplexes entweder stillgelegt oder sogar degradiert werden [61]. Auch für VACV Infektionen konnte in mehreren Studien durch die Inhibition verschiedener viraler Transkripte eine effektive Verminderung der Virusreplikation erreicht werden [62-64].

e) Inhibition der Virusfreisetzung: TPOXX, Gleevec

Die antivirale Wirkstoffgabe von TPOXX (ST-246, Tecovirimat) war gegen verschiedene OPV Spezies wie VARV, MPXV, CPXV und VACV sowohl *in vitro* als auch in Mäusen und nichthumanen Primaten erfolgreich [65-67]. Zudem wurde es in Kombination mit anderen antiviralen Substanzen als sogenannte *Emergency-Investigational New Drug* (E-IND) erfolgreich und ohne schwere Nebenwirkungen bei pockenerkrankten Menschen eingesetzt [68, 69]. Es handelt sich hierbei um einen Inhibitor der viralen Phospholipase F13L, der eine vollständige Reifung und die Freisetzung der Viren unterdrückt [70]. Trotz der Identifikation erster Resistenzen in CPXV BR [71], ist TPOXX aufgrund seiner guten Verträglichkeit und oralen Verfügbarkeit bei hoher antiviraler Effektivität der vielversprechendste Kandidat auf eine baldige Zulassung zur Behandlung von Pockeninfektionen [72].

Mit Gleevec konnte die VACV Verbreitung *in vivo* durch die Inhibition von Tyrosinkinasen der Ablund Src-Familie limitiert werden [73]. Diese phosphorylieren im aktiven Zustand das virale A36 Protein, wodurch die Polymerisation zellulärer Aktin-Filamente induziert wird, wovon wiederum die Weitergabe von CEVs zu nicht-infizierten Zellen abhängig ist [74].

f) Inhibition auf Immunebene: VIG, Imiquimod

Die erste entwickelte antipockenvirale Therapie bestand in der Behandlung schwerwiegender OPV Infektionen mit dem Vaccinia Immunglobulin (VIG), bei dem es sich um aufgereinigte, gepoolte Antikörper aus Blut von vakzinierten Personen handelt [75]. VIG neutralisiert sowohl reife als auch unreife infektiöse Virionen, sodass diese am Zelleintritt gehindert werden [76]. Es wird auch heute noch als erste Therapiemaßnahme bei Personen verwendet, die an Impfkomplikationen leiden [77]. Zu den heute noch geimpften Personen zählen u. a. gefährdete Personen aus den Bereichen Forschung, Versorgung und Verteidigung und deren Angehörige (auf freiwilliger Basis) in den USA [78].

Ein weiterer OPV Inhibitor auf Immunebene ist Imiquimod, welches durch Stimulation von Toll-like Rezeptoren die Expression verschiedener inflammatorischer Proteine induziert und somit für einen antiviralen Status der Zellen und deren Umgebung sorgt [79]. Für Imiquimod konnte in Mäusen gezeigt werden, dass eine topische Anwendung als 1 %ige Creme zu einer signifikant verlängerten Überlebenszeit VACV infizierter Tiere führte [80]. Auch für Viren anderer Pockenvirus-Genera, wie z. B. Molluscum contagiosum oder Parapockenviren konnte die Wirksamkeit von Imiquimod nachgewiesen werden [81, 82].

g) Inhibition der Virus-Signalgebung: Gefitinib

Gefitinib ist ein kleines Molekül, welches den zellulären epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) und somit die nachfolgende intrazelluläre Signalgebung inhibiert, was u. a. einen Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation und die Apoptose hat [83, 84]. OPV kodieren für ein Analog des humanen epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), der für die Stimulation des EGFR verantwortlich ist [85]. Die Deletion dieses Proteins konnte direkt mit einer verringerten Virulenz von VACV assoziiert werden [86]. Von unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch eine Gefitinib-Behandlung von Infektionen mit verschiedenen OPV Spezies *in vitro* eine signifikante Inhibition der Virusreplikation und -verbreitung zu erzielen war [87]. Eine Wirksamkeit *in vivo* konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Gefitinib ist neben Imiquimod und Gleevec einer der wenigen antipockenviralen Wirkstoffe, der wirtsgerichtet agiert und nicht das Virus an sich als Ziel besitzt.

1.2. 3D-Zellkultivierung

1.2.1. Monolayer- vs. 3D-Kultivierung

Konventionelle Monolayer Zellkultursysteme, in denen Zellen typischerweise auf flachen und starren Unterlagen kultiviert werden, wurden in den vergangenen Jahrzehnten für eine Vielzahl von unterschiedlichen zellbasierten Fragestellungen eingesetzt [88]. Seitdem 1949 entdeckt worden war, dass Polioviren in Zellkulturen von nicht-neuronalen Zellen replizieren können - was 1954 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde - stellen Zellkulturen auch in der Virologie ein einfaches, schnelles und kosteneffizientes Werkzeug dar, um diagnostische, charakterisierende und auch funktionelle Analysen in vitro durchzuführen [89]. Zwar sind Monolayer Zellkultursysteme auch die Standardmethode für die Viruspropagierung sowie biochemische weiterhin und molekularbiologische Untersuchungen der Virusreplikation, mit deren Hilfe über Jahre zahlreiche aufwendige und ethisch kritikwürdige Tierversuche eingespart werden konnten, jedoch werden mit fortschreitendem Wissensstand auch die Limitationen dieser Kultivierungsmethode immer deutlicher [90, 91]. Monolayer-kultivierte Zellen wachsen im Gegensatz zur jeweiligen in vivo Situation in einer artifiziellen Weise, die weder berücksichtigt, dass die meisten Zellen in einem Gewebe in allen räumlichen Dimensionen von vielen teils unterschiedlichen Zellen umgeben sind, noch der Tatsache Rechnung tragen, dass das physiologische Umfeld von Zellen auch aus azellulären Komponenten wie einer extrazellulären Matrix (EZM) besteht. Als Resultat ist neben der reinen morphologischen Änderung der Zellen auch ein generell verändertes Verhalten der Zellen auf molekularer Ebene zu beobachten [92]. Dies hat u. U. eine veränderte Zellantwort auf externe Stimuli wie Virusinfektionen oder Behandlungen mit Medikamenten zur Folge und führt im schlimmsten Fall dazu, dass irreführende, nicht-prädiktive Daten erhoben werden, deren Übertragung auf einen komplexen Organismus nicht möglich ist [93, 94]. Im Zusammenhang mit der Erforschung neuer (antiviraler) Medikamente, deren Wirksamkeit häufig zunächst in Monolayer Kulturen und im Erfolgsfall in Tierversuchen und später in klinischen Studien im Menschen analysiert wird, ist dieser "schlimmste Fall" in den vergangenen Jahren zu etwa 90 % eingetreten. Nur in einem von zehn Fällen erlangte ein in vitro aussichtsreich scheinendes Medikament auch die Marktreife und scheiterte nicht aufgrund fehlender klinischer Effizienz oder inakzeptabler Toxizität [95, 96]. Zumindest anteilig ist dies direkt auf den unphysiologischen Charakter von Monolayer Kultivierungen zurückzuführen. In der Virologie sind neben der differentiellen Reaktion auf Medikamente, wie zum Beispiel antivirale Substanzen, vor allem generelle Zellcharakteristika von Bedeutung, die durch Monolayer-Kultivierungen stark vom in vivo Zustand abweichen können. So wurde z. B. beschrieben, dass die Zellpenetration, die Replikation und/oder die Reifung verschiedener Viren aufgrund fehlender Zelldifferenzierung oder -polarisation nicht erfolgreich in Monolayer-Kulturen ablaufen konnte [97-99].

Aber auch die Erforschung permissiver Infektionen kann in Monolayer-Kulturen wegen etwaiger artifizieller Expressionsmuster oder Virus-/Wirt-Interaktionen beeinflusst werden und somit zur Vorhersage unphysiologischer Phänomene beitragen, die sich negativ auf weiterführende Versuche auswirken können [100]. Eine Übersicht über ausgewählte virologische Fragestellungen, die durch die Monolayer Kultivierung negativ beeinflusst werden können, ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Fragestellung	Limitationen der 2D-	Mögliche Konsequenzen
	Kultivierung	
Virusanzucht	regelmäßiges	keine Anzucht von niedrigtitrigen und langsam
	Passagieren notwendig	replizierenden Viren möglich
Virusreifung	unvollständige	Replikation/Reifung bestimmter Viren nicht möglich
	Zelldifferenzierung	
Virusdiagnostik	unvollständige	Replikation/Reifung und somit Diagnostik bestimmter
	Zelldifferenzierung	Viren nicht möglich
Pathogenitäts-	generell artifizielle	unrealistische Estimierung der Pathogenität
bestimmung	Zellcharakteristika	
Host-Range-	generell artifizielle	unvollständige Bestimmung replikationskompetenter
Bestimmung	Zellcharakteristika	Organismen; falsche Bewertung zoonotischer Potentiale
Expression und Funktion	artifizielle	Unrealistische Expressionsmuster und Wege der
viraler Proteine	Genregulation	Manipulation des Wirts
Wirtsantwort auf	artifizielle	Unrealistischer Expressionsmuster und Wege der
Infektionen	Genregulation	zellulären Intervention

Tab. 1: Limitationen der Monolayer Zellkultivierung in der Virologie

In den letzten Jahren konnten große Fortschritte in der Entwicklung von dreidimensionalen Zellkulturmodellen erzielt werden, die mittlerweile in unterschiedlichen biologischen Forschungsgebieten als Standardmethode zur Zellkultivierung eingesetzt werden [101]. Im Gegensatz zu Monolayer Kulturen wachsen 3D-kultivierte Zellen in einer gewebeähnlichen Mikroumgebung, welche eher die Umwelt von Zellen in vivo reflektiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich Zellen in Monolayer- und 3D-Zellkultursystemen sowohl morphologisch als auch physiologisch sehr voneinander unterscheiden. 3D-kultivierte Zellen bilden stärkere Interaktionen mit benachbarten Zellen und der nur bei 3D-Kultivierung vorhandenen extrazellulären Matrix aus und wachsen in einigen Modellen zelltypabhängig in mehreren Schichten [102]. Morphologisch ähneln 3D-kultivierte Zellen deutlich mehr ihren in vivo Gegenstücken als die stark ausgebreiteten, flachen Zellen in Monolayer-Kulturen [91]. Zudem ist in 3D-Zellkulturen eine in vivo-ähnliche polarisierte Expression verschiedener zellulärer Membranproteine zu beobachten, deren Expressionsrichtung kritisch für deren Funktion im jeweiligen Gewebe ist [103]. Die Kultivierungsart hat zudem einen fundamentalen Einfluss auf die Expression zellulärer Gene und Proteine. Es konnte gezeigt werden, dass sich 3Dkultivierte Zellen diesbezüglich einmal mehr wie Zellen in einem Gewebe verhalten [101, 104].

Eine Zellkulturmodell-abhängige differentielle Expression und Verteilung von zellulären Oberflächenrezeptoren kann z. B. Auswirkungen auf den Zell-Zell-Kontakt, die intrazelluläre Signaltransduktion, die dadurch regulierte Genexpression und letztlich auf das Verhalten der Zellen an sich haben [91]. Dadurch können sich wiederum zelluläre Funktionen wie die Proliferation, Apoptose und Viabilität in Monolayer- und 3D-Kulturen deutlich voneinander unterscheiden, wobei sich 3D-kultivierte Zellen i. d. R. eher so verhalten, wie es bei Zellen *in vivo* analysiert werden konnte [103].

1.2.2. Möglichkeiten der 3D-Kultivierung

Je nach Anwendung und Fragestellung bieten sich verschiedene Ansätze für die 3D-Kultivierung von Zellen an. Die folgende Aufführung von Möglichkeiten der 3D-Zellkultivierung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und soll lediglich einen Überblick über etablierte Kultivierungsansätze unterschiedlicher biologischer Komplexität liefern (Abb. 4).

a) Beschichtung von Zellkulturplatten mit biologischen Komponenten

Die einfachste Methode, Zellen in einer 3D-ähnlichen Umgebung zu kultivieren, besteht in der Beschichtung von Polystyren-Zellkulturplatten mit Komponenten der EZM. Da Matrixproteine wie Kollagene für eine Vielzahl von Zellen *in vivo* einen Bindungspartner mit dem jeweiligen Bindegewebe darstellen, werden diese auch am häufigsten als Beschichtungsmaterial für eine *in vivo*ähnlichere Kultivierung von Zellen *in vitro* eingesetzt [105]. Kollagen I als häufigstes Protein der EZM wird dabei meist für die Kultivierung von Epithel- und Endothelzellen sowie Muskelzellen und Hepatozyten eingesetzt. Um Kultivierungsbedingungen von größerer physiologischer Relevanz zu erzeugen, kann zur Beschichtung auch stellvertretend für die im Gewebe direkt zellassoziierte Basallamina deren Hauptkomponente Kollagen IV verwendet werden [106]. Weitere Basallamina-Proteine wie Fibronectin und Laminin, welche *in vivo* mit zellulären Integrinen eine Zell-Matrix-Bindung ausbilden, stehen ebenfalls als gängige Beschichtungsmaterialen zur Verfügung [107]. Trotz der im Vergleich zur Monolayer-Kultivierung zusätzlichen biologischen Faktoren, deren Präsenz für die Generierung von 3D-Zellkulturen unabdingbar ist, können bloße Beschichtungen von Zellkulturplatten mit diesen Proteinen nur bedingt als 3D-Kulturen angesehen werden, da ihnen die zusätzliche räumliche, strukturgebende Komponente fehlt.

b) Feste Gerüste (Solid Scaffolds) aus nicht-biologischem Material

Obwohl es eine Vielzahl von Materialien gibt, mit denen feste Gerüste für die 3D-Kultivierung hergestellt werden können (u. a. Metall, Keramik, Glas), werden zu diesem Zweck am häufigsten Polymere verwendet [108].

Durch verschiedene Fabrikationstechnologien wie Soft-Lithographie, Elektrospinnen, Bioprinting, u. v. a. können Matrizes von unterschiedlicher Größe, Struktur, Festigkeit, Porosität und Permeabilität produziert werden. Ein Hauptkriterium beim Design der Matrizes ist die Größe und Topographie von internen Strukturen, die möglichst denen biologischer EZMs ähneln sollten. Kleinste Abweichungen vom Nanomaßstab der EZM-Infrastruktur, durch den die Morphologie und das Verhalten der Zellen *in vivo* maßgeblich beeinflusst wird, können diverse Effekte auf die Zellphysiologie haben – bis hin zur Monolayer-ähnlichen Ausbreitung und Abflachung der Zellen bei zu großen Oberflächen [109, 110]. Unabhängig vom gewählten Maßstab haben zudem die chemischen Eigenschaften des verwendeten Materials, die Festigkeit sowie die Permeabilität der Matrix und die wirkenden mechanischen Kräfte einen großen Einfluss auf die Zelladhäsion, das Wachstum und das Verhalten der Zellen [111].

c) Sphäroide

Sphäroide stellen ein einfaches, gerüstfreies 3D-Zellkultursystem dar, welches für eine Vielzahl von Zelltypen anwendbar ist. Für die Generierung von Sphäroiden wird die Eigenschaft vieler Zellen genutzt, unter bestimmten Bedingungen, die eine Adhärenz auf einer geeigneten Unterlage verhindern, zu multizellulären, kugelförmigen Aggregaten zu akkumulieren. Diese Bedingungen können z. B. in unterschiedlichen Suspensionskulturverfahren wie der Hanging Drop-Methode, in Rotationskulturen, Bioreaktoren oder mit speziell beschichteten Zellkulturplatten (ulta-low attachement Platten) geschaffen werden [112]. Durch das avaskuläre Wachstum der Zellen in mehreren Schichten bilden sich automatisch Nährstoff-, Sauerstoff- und Metaboliten-Gradienten aus, durch welche gleichzeitig die Größe der Sphäroide auf etwa 100 µm begrenzt wird, da die zentralgelegenen Zellen sonst nekrotisieren würden [113]. Das inhomogene, durch Gradienten definierte Wachstum der Zellen ist für bestimmte biologische Fragestellungen wie die Karzinogenese und Stammzelldifferenzierung aufgrund des in vivo-ähnlichen Wachstumsverhaltens von besonders physiologischer Relevanz [114]. Durch Sphäroide können in diesen Forschungsgebieten also deutlich in vivo-nähere Untersuchungen durchgeführt werden als in Monolayer- oder sogar komplexeren 3D-Kulturen. Wegen ihrer Unabhängigkeit von Matrizes bieten Sphäroide im Vergleich zu anderen 3D-Zellkultursystemen zudem erhebliche Vorteile in Sachen Visualisierung, da sie im Gegensatz zu den komplexeren Ansätzen direkt über konfokale Laserscanningmikroskopie o.ä. Verfahren abgebildet werden können und nicht erst aufwendig präpariert werden müssen [115].

d) Biologische und synthetische Hydrogele

Hydrogele bestehen aus Netzwerken von quervernetzten Polymerketten oder Proteinen. Wegen ihres hohen Wassergehalts besitzen sie biophysikalische Charakteristika, die denen der natürlichen Gewebe sehr ähneln. Hydrogele können entweder mit anderen Technologien wie festen Gerüsten (s. o.) kombiniert werden, als Beschichtungsmaterial für Polystyrenplatten verwendet werden oder als alleinstehende Matrix für die Generierung von 3D-Kulturen fungieren, indem die verwendeten Zellen von der Matrix ummantelt werden. Die Physiologie der Zellen in der 3D-Kultur ist dabei abhängig von biochemischen, biophysischen und physikalischen Eigenschaften der Matrix, die in ihrer Zusammenstellung hochvariabel sind und jeweils für verschiedene Zelltypen und Fragestellungen angepasst und optimiert werden müssen [116].

Biologische Hydrogele bestehen typischerweise aus Kombinationen mehrerer EZM-Komponenten und sind in optimierten Formulierungen von verschiedenen Herstellern kommerziell erhältlich (z. B. Matrigel[®], Corning). Aufgrund des natürlichen Ursprungs der Komponenten sind diese Gele biokompatibel und bioaktiv [117]. Durch die Präsenz verschiedener endogener Faktoren werden viele zelluläre Funktionen gefördert, die sich positiv auf das *in vivo*-ähnliche Verhalten bezüglich Viabilität, Proliferation, Apoptose und Entwicklung der kultivierten Zellen auswirken können [118].

Synthetische Hydrogele bestehen aus nicht-natürlichen Materialien wie Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylalkohol (PVOH) oder anderen Polymeren [119]. Sie sind biologisch inert, bieten jedoch strukturelle Unterstützung für eine Vielzahl von Zelltypen, die während der Kultivierung selbst eine EZM bilden können und somit nach dem sukzessiven Abbau der synthetischen Materialien in einem selbstsynthetisierten biologischen 3D-System weiterkultiviert werden können [120]. Zur weiteren Unterstützung des natürlicheren Zellverhaltens von Beginn an können synthetische Hydrogele auch durch biologische Komponenten wie Wachstumsfaktoren, EZM-Komponenten und andere Moleküle modifiziert werden [121].

e) Biologische dezellularisierte extrazelluläre Matrizes

Durch verschiedene physikalische, chemische und/oder enzymatische Methoden können natürliche Gewebe komplett dezellularisiert werden, wodurch letztlich lediglich die extrazelluläre Matrix zurückbleibt, die im Idealfall von ihrer Makro- und Mikroarchitektur durch den Dezellularisierungsprozess unbeeinflusst bleibt [122]. Die extrazelluläre Matrix erfüllt für die 3D-Kultivierung mehrere kritische Funktionen. Zunächst stellt sie ein komplexes Gerüst aus verschiedenen strukturellen Proteinen wie Kollagenen, Fibronectin und Lamininen dar, durch die die physikalische Mikroumgebung der Zellen definiert wird [123].

Spezifische Adhäsionsmotive dieser EZM-Proteine werden durch zelluläre Oberflächenproteine, die Integrine, gebunden, wodurch teilweise die Zellmorphologie, die Interaktion der Zellen untereinander und das zelluläre Verhalten an sich bestimmt wird [124]. Nach dem Dezellularisierungsprozess können zudem Wachstumsfaktoren und andere Signalproteine in der EZM zurückbleiben, die den Zellen zur Verfügung gestellt werden und Einfluss auf die Zellentwicklung, die Proliferation und Viabilität haben [125]. Zudem hat die EZM Einfluss auf die räumlich-zeitliche Freisetzung von löslichen Proteinen, die sich u. a. auf EZM-Remodellierungsprozesse auswirken, welche von großer Bedeutung für die Ausbildung der zellulären Mikroumgebung und die Gewebshomöostase sind [126]. Dezellularisierte EZMs, die aus natürlichen Geweben gewonnen werden, haben im Vergleich zu vielen anderen Ansätzen der 3D-Zellkultivierung den Vorteil, dass ihnen trotz des relativ geringen Aufwands für ihre Präparation eine große Ähnlichkeit zur *in vivo* Situation und eine hohe biologische Komplexität inhärent sind [127].

f) Organotypische epitheliale Raft-Kulturen

Bei den epithelialen Raft-Kulturen handelt es sich um ein 3D-Zellkultursystem, bei dem Keratinozyten auf ein *in vitro* generiertes Äquivalent einer dermalen Schicht, bestehend aus Fibroblasten und ausgelierten EZM-Komponenten, aufgebracht werden, um schließlich durch eine Kultivierung an der Schnittstelle zwischen Zellkulturmedium und Luft voll ausdifferenzieren zu können [128]. Für die auf diese Weise generierten organotypischen Hautäquivalente können sowohl Primärzellen als auch Zelllinien mit ausreichendem Differenzierungspotential (z. B. HaCat-Zellen) verwendet werden [129, 130]. Durch Raft-Kulturen ist es möglich, die morphologischen und physiologischen *in vivo* Charakteristika der Haut akkurat nachzubilden und zu studieren [131]. Die lokal voneinander abgegrenzte Co-Kultivierung der Fibroblasten in der Dermis und der Keratinozyten in der Epidermis in Kombination mit der Einbettung in die physiologische EZM erlaubt eine komplexe Interaktion *in vivo* korrespondierender Zelltypen, wie sie in anderen Zellkultursystemen nicht nachzustellen ist. Für verschiedene Fragestellungen, für deren Analyse diese Interaktionen und/oder die Ausbildung einer komplett differenzierten epidermalen Schicht von Nöten ist, wie z. B. die Untersuchung chemischer exogener Noxen oder die Charakterisierung epitheliotroper Viren, ist die Verwendung der Raft-Kulturen obligatorisch [132, 133].

g) Organs-on-a-chip

Beim komplexesten aller 3D-Zellkulturansätze handelt es sich um eine Vorrichtung, bei der verschiedene gewebetypische Zellkultursysteme auf einem Mikrochip aufgebracht und durch einen kontinuierlichen mikrofluidischen Mediumstrom miteinander verbunden sind. Durch dieses System werden nicht nur die in vivo-typischen Architekturen einzelner Gewebe nachgebildet, sondern auch Schnittstellen zwischen in vivo interagierenden Organen, physikochemische Mikroumgebungen und eine Blutgefäß-ähnliche Durchströmung aller Komponenten geschaffen, die eine Untersuchung von Gewebs- und Organfunktionalität auf einem Level ermöglicht, welches durch andere Zellkulturansätze nicht zu erreichen wäre [134]. Die Organ-on-a-chip Technologie ermöglicht neben Analysen der physiologischen Gewebeentwicklung und -interaktion auch die systemische Erforschung von Krankheitsentstehung und -verbreitung innerhalb eines Organismus sowie die komplexe Charakterisierung von zu testenden Wirkstoffen mit Hinblick auf Wirkspezifität und Toxizität [135-138]. Aufgrund seiner in vivo-ähnlichen Komplexität könnte dieses Zellkultursystem, welches je nach remodellierten Organen auch aus der Kombination verschiedenen bereits vorher vorgestellter 3D-Zellkulturmodelle bestehen kann, allen anderen Zellkultivierungsansätzen bezüglich der Prädiktion auf das in vivo Geschehen überlegen sein [139]. Dieser Grad der Komplexität ist jedoch auch der Grund für eine eingeschränkte Anwendbarkeit, da im Vergleich zu anderen 3D-Zellkulturmodellen überproportional viel fachliche Expertise, Geldmittel und Zeit zur Etablierung des Modells aufzuwenden sind.



Abb. 4: Verschiedene 3D-Zellkulturmodelle und deren biologische Komplexität. Dargestellt sind ausgewählte Ansätze der 3D-Zellkultivierung und eine Einordnung in eine biologische Komplexitätsskala. Die Einordnung erfolgte gemäß der Komplexität der eingesetzten biologischen Komponenten einerseits und der zu erwartenden Komplexität gebildeter biologischer Komponenten und Interaktionen in der generierten 3D-Zellkultur andererseits [140-143].

1.2.3. 3D-Kultivierung in der Virologie

Verschiedene 3D-Zellkultursysteme werden seit Jahrzehnten in unterschiedlichen Forschungsfeldern verwendet. So konnte man z. B. mit Hilfe von 3D-Kulturen enorme Fortschritte in der Stammzellforschung machen, da erst durch die in vivo-ähnliche Kultivierung von Stammzellen deren Entwicklungs- und Differenzierungspotential ausgeschöpft werden konnte [144]. In der Tumor-Zellbiologie konnte durch Sphäroid-Kulturen die heterogene, durch Gradienten definierte Morphologie von Tumoren nachgebildet und studiert werden, welche somit deutlich eher der natürlichen Physiologie entspricht als die der konventionellen Monolayer-Kulturen [145]. Bei pharmakologischen Studien tragen 3D-Zellkulturen seit Jahren zur Verbesserung der zellbasierten Medikamententestung und somit zur Verringerung von damit assoziierten Kosten und Tierversuchszahlen bei [146]. Und auch im Bereich Geweberegeneration und -rekonstruktion konnten durch die 3D-Kultivierung von Zellen ernsthafte Alternativen zur Verwendung von Biomaterial geschaffen werden, indem z. B. EZMs aus dezellularisierten Geweben für die Generierung implantierbarer Organe genutzt wurden [147]. In der Virologie wurden im Gegensatz dazu in der Vergangenheit nur wenige 3D-Zellkultursysteme zu Forschungszwecken etabliert [100]. Dennoch können, wie schon erwähnt, mit konventionellen Monolayer-Kultivierungen viele virologische Fragestellungen nicht hinreichend geklärt werden. Im Folgenden sind die prominentesten Beispiele von Infektionsmodellen beschrieben, die nur mit Hilfe von 3D-Zellkulturmodellen etabliert werden konnten und ohne deren Hilfe eine Charakterisierung der jeweiligen Viren nicht möglich gewesen wäre. Zudem sind aufgrund des in dieser Arbeit verwendeten Kuhpockenvirus Fortschritte in der 3D-Kultivierung von OPV aufgeführt. Eine Aufführung von 3D-Zellkultursytemen für Viren, deren Replikation zwar nicht vom Zellkulturmodell abhängig ist, deren Erforschung im *in vivo*-ähnlichen Kontext jedoch beträchtliche Mehrinformationen einbrachte, folgt abschließend.

a) Humane Papillomviren

Als Paradebeispiel für die Sinnhaftigkeit und Notwendigkeit von 3D-Zellkulturmodellen auch in der Virologie gilt das Infektionsmodell humaner Papillomviren (HPV) in organotypischen epithelialen Raft-Kulturen. Bei den HPV handelt es sich um eine große Gruppe von doppelsträngigen DNA Viren, die teilweise in der Lage sind, in humanen Geweben Zervixkarzinome oder andere anogenitale Karzinome zu induzieren und je nach Gefährdungspotential in verschiedene Risikogruppen von niedrig bis hoch eingeteilt sind [148]. Die vollständige Replikation und Reifung von HPV ist stark abhängig von den Differenzierungsstadien der epithelialen Wirtszellen.

Zwar werden einige virale Nicht-Strukturproteine in geringem Maße auch in proliferativen Zellen, die in humaner Haut z. B. hauptsächlich in der basalen Schicht vorhanden sind und in Monolayer-Kulturen ansatzweise die ganze Zellpopulation ausmachen, exprimiert, jedoch findet die stärkste Virusproteinexpression und die Virusreifung in (terminal) differenzierenden Zellen statt (Abb. 5) [149]. Da Epithelzellen in konventionellen Monolayer-Kulturen ein solches Differenzierungsprogramm nicht durchlaufen, ist somit auch keine Reifung von HPV möglich [99]. Der Durchbruch für die Studie von HPV gelang erst durch die Anwendung der Raft-Kulturen, da durch diese die epithelialen Differenzierungsschritte in vivo-ähnlich nachgebildet werden konnten und somit auch erstmals ein kompletter Lebenszyklus von HPV inklusive viraler Morphogenese in vitro vollzogen werden konnte [150]. In den letzten Jahren wurde mit Hilfe dieser 3D-Kulturen die Erforschung der Virus-Wirt Interaktionen, der Interaktionen von HPV mit anderen epitheliotropen Viren und antiviraler Therapien stark vorangetrieben [151, 152]. Zudem konnten wertvolle Erkenntnisse über die Mechanismen der HPV induzierten Karzinogenese gewonnen werden [153].



Abb. 5: Beispiel einer zellkulturmodellabhängigen Virusreifung humaner Papillomviren (HPV) in 3D Raft-Kulturen (nach [154]). Durch Mikroverletzungen gelangen die Viren zu den basal gelegenen, proliferierenden Keratinozyten, in denen die Infektion etabliert wird, jedoch nur eine geringe virale Genexpression stattfindet. Die Virusreplikation findet erst in den suprabasalen Schichten statt, in die das Virus durch Differenzierungsprozesse gelangt. Die Infektion bewirkt morphologische Abnormalitäten der Wirtszellen (u. a. eine Papillomatose). Virionen werden durch Desquamation freigesetzt.

b) Parvoviren

Die Mitglieder der Parvoviren sind kleine, einzelsträngige DNA Viren, die häufig mit respiratorischen Erkrankungen assoziiert sind [155]. Unter den Parvoviren befinden sich u. a. die fünf Spezies der humanen adeno-assoziierten Viren (AAV), die dem Genus Dependovirus angehören. Wie der Name impliziert, ist deren Replikation in konventionellen Monolayer-Kulturen abhängig von anderen (Helfer-) Viren, ohne die die AAV in eine Latenz übergehen [156]. Etwa 80 bis 90 % der erwachsenen Population ist seropositiv für AAV und eine direkte Korrelation mit einem spezifischen Krankheitsbild oder einer Pathologie konnte lange Zeit nicht festgestellt werden [157].

Mit Hilfe epithelialer Raft-Kulturen konnte erstmals ein Infektionsmodell eingesetzt werden, mit dem der komplette Lebenszyklus von AAV2 ohne Zuhilfenahme anderer Viren möglich war [158]. Die Reifung korrelierte mit der Differenzierung der kultivierten Keratinozyten und die reifen Partikel waren in subrabasalen, granulären Schichten zu detektieren, die in Monolayer-Kulturen in Ermangelung terminaler Differenzierung nicht vorhanden sind. In diesen Schichten konnten zudem durch die AAV2 Infektion histologische Veränderungen beobachtet werden, die durch virusinduzierte Zytopathologie hervorgerufen wurden. Nur durch die Anwendung eines 3D-Zellkulturmodells konnte somit herausgefunden werden, dass es sich bei AAV2 um ein epitheliotropes, autonom replizierendes Virus handelt, welches im Gegensatz zu anderen AAV entgegen bis dahin geltender Meinung mit einer spezifischen Pathologie assoziiert ist.

c) Hepatitis E Viren

Beim Hepatitis E Virus (HEV) handelt es sich um ein einzelsträngiges RNA Virus, welches mehrere humanpathogene Subtypen umfasst, die teilweise auch zoonotisches Potential besitzen [159]. Zwar konnte vor kurzem die erste vakzinbasierte Therapie in China lizensiert werden, dennoch ist der Lebenszyklus der HEV inklusive aller zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bisher in Ermangelung effizienter Zellkultursysteme und Tiermodelle sehr schlecht verstanden [160, 161]. Kürzlich konnten erste bedeutende Fortschritte mit einem Sphäroid-basierten 3D-Zellkultursystem von Hepatoblastomzellen (PLC/PRF/5) erzielt werden, mit dem im Gegensatz zu korrespondierenden Monolayer-Kulturen eine effiziente Virusreplikation und Reifung über mehrere Monate möglich war [162]. Zudem konnte nur im 3D-Infektionsmodell eine kontinuierliche Freisetzung infektiöser Partikel beobachtet werden. Trotz dieser Fortschritte steht die 3D-Kultivierung für die Erforschung von HEV noch am Anfang, birgt jedoch großes Potential für die Zukunft.

d) Noroviren

Noroviren (NoV) sind einzelsträngige RNA Viren aus der Familie der *Caliciviridae*, die beim Menschen Gastroenteriden hervorrufen und bereits seit 1972 morphologisch charakterisiert sind [163]. Jedoch stand der detaillierten Erforschung der NoV lange Zeit entgegen, dass es kein verlässliches, reproduzierbares *in vitro* Zellkultursystem für die Viruskultivierung gab [164]. Mit der Beschreibung zweier Mikro-Carrier-basierter 3D-Zellkulturmodelle schien jeweils eine Möglichkeit gefunden worden zu sein, NoV *in vitro* propagieren zu können [165, 166]. Jedoch wurden beide Ansätze von unterschiedlichen Arbeitsgruppen widerlegt, weshalb weiterhin unklar ist, ob durch 3D-Zellkultivierung tatsächlich eine verbesserte NoV Replikation zu erreichen ist [167]. Der Streit darüber dauert an und weitere Forschung muss in diesem Zusammenhang Klarheit schaffen.

e) Orthopockenviren

Trotz der Möglichkeit, Orthopockenviren (OPV) in konventionellen Monolayer-Kulturen zu studieren, wurden für verschiedene OPV wie VACV, CPXV und andere in der Vergangenheit mehrere Studien in epithelialen Raft-Kulturen durchgeführt, um deren Replikation unter in vivo-ähnlichen Bedingungen analysieren zu können [133]. So konnte gezeigt werden, dass in 3D-Kultur infektionsinduzierte zytopathische Effekte auftraten, die in vivo auftretenden Läsionen auf humaner Haut ähnelten. Zudem wurde von der gleichen Forschungsgruppe die Aktivität verschiedener antiviraler Substanzen in 3D-Kultur getestet und mit der in korrespondierenden Monolayer-Kulturen verglichen [66, 168]. Hierbei zeigte sich, dass Therapien i. d. R. im komplexeren Zellkulturmodell deutlich selektiver waren, der Quotient aus der Konzentration, bei der eine effektive antivirale Wirkung einsetzte zu der Konzentration, bei der eine Zytotoxizität zu beobachten war, also im Vergleich zur Monolayer-Kultur deutlich größer war. Durch eine andere Arbeitsgruppe konnte das 3D-Raft Zellkulturmodell kürzlich als Infektionsmodell für ein CPXV Isolat aus einer Hausratte und den Referenzstamm CPXV BR, der auch in der hier vorliegenden Arbeit als infektiöser Erreger verwendet wurde, bestätigt werden [169]. Es konnte ebenfalls eine infektionsinduzierte Histopathologie sowie Genexpressionsänderung festgestellt werden, die allerdings im Gegensatz zu gängigen Tiermodellen keine stammabhängigen Unterschiede aufwies. Eine detailliertere molekulare Analyse von OPV Infektionen in 3D-Zellkulturmodellen v. a. auf Wirtsebene wurde bis zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht publiziert (Stand: 09/2017).

f) 3D-Infektionsmodelle für andere Viren

Für eine Vielzahl anderer viraler Erreger wurden, ähnlich wie für OPV Infektionen, verschiedene 3D-Infektionsmodelle etabliert, um deren Lebenszyklus und Virus-Wirt-Interaktionen sowie Effekte von antiviral wirkendenden Medikamenten unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen studieren zu können [100].

So wurde für die Behandlung des Humanen Immundefizienz-Virus (**HIV**) mit unterschiedlichen Protease-Inhibitoren in epithelialen Raft-Kulturen gezeigt, dass sich diese Therapien negativ auf das Wachstum der oralen Epithelzellen auswirken [170-173]. Andere 3D-Infektionsmodelle für HIV wurden zudem für die Analyse der Neuropathogenese sowie zur Entwicklung neuartiger antiviraler Medikamente entwickelt [174].

Für das Hepatitis C Virus (**HCV**) stellt die konventionelle Monolayer-Kultivierung zwar das Standard-Infektionsmodell dar, jedoch ist nur durch 3D-Zellkultivierung eine *in vivo*-ähnliche Polarisation und Differenzierung der zu infizierenden Hepatozyten nachzubilden, wodurch erst die komplexe, physiologische Umwelt für die Infektion mit HCV geschaffen werden kann. Drei unabhängige 3D-Zellkulturmodelle wurden bis dato für Studien des HCV Lebenszyklus etabliert [175-177].

Für Herpes-simplex-Viren (**HSV**), die i. d. R. epitheliale Gewebe infizieren, werden schon seit über zwei Jahrzehnten epitheliale Raft-Kulturen verwendet, mit deren Hilfe physiologisch relevante Studien zur Infektion, Replikation und Übertragung von HSV durchgeführt werden konnten [133, 178]. Zudem wurde die Wirksamkeit antiviraler Substanzen unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen getestet [179].

Für die vorrangig in Epithelzellen replizierenden, wenig pathogenen Adenoviren (**AdV**), die in der Medizin für den Gentransfer in Tumorzellen oder als onkolytische Viren genutzt werden, blieben durch die Anwendung konventioneller Monolayer-Kulturen viele Fragen bezüglich der komplexen Virus-Wirt-Interaktionen oder spezifischer Einschränkungen der Virusverteilung und -verbreitung ungeklärt [180]. Durch die Etablierung Sphäroid- und Raft-Kultur-basierter 3D-Zellkulturmodelle konnte in den letzten Jahren in verschiedenen Arbeiten über Fortschritte zur Beantwortung dieser Fragen berichtet werden [181-183].

Erst kürzlich wurde mit Hilfe zerebraler Sphäroide ein 3D-Infektionsmodell für ZIKA Viren (**ZIKV**) etabliert, mit dessen Hilfe die Auswirkungen der Infektion auf das Gehirn *in vitro* nachgebildet werden konnten [184]. Die Infektion führte zu erhöhten Apoptose- und verringerten Proliferationsraten der infizierten Zellen, was zu einem reduzierten Volumen der neuronalen Zellschichten führte. Ähnliche molekulare und morphologische Mechanismen werden auch hinter der Entstehung der ZIKV induzierten Mikrozephalie vermutet.

1.3. Matrix der Auto Tissue Berlin GmbH

Die in dieser Arbeit zur Generierung verschiedener 3D-Zellkulturen verwendete dezellularisierte extrazelluläre Matrix (EZM) wurde im Rahmen einer Kooperation von der Auto Tissue Berlin GmbH bezogen. Es handelt sich dabei um eine EZM, die mittels eines patentierten Dezellularisierungsprotokolls (s. u.) aus equinem Perikard, welches als Nebenprodukt auf Schlachthöfen anfällt, generiert wird.

1.3.1. physiologischer Kontext

Beim Perikard handelt es sich um einen stark bindegewebshaltigen Sack ("Herzbeutel"), der die äußere Schicht des Herzens bildet und dieses einerseits vor äußeren Einflüssen schützt und außerdem die Ausdehnung und Kontraktion des darunterliegenden Myokards ermöglicht. Das Perikard besteht aus zwei Teilen. Das *Pericardium fibrosum* ist die äußere Schicht, die aus straffem Bindegewebe besteht und eine rein abgrenzende Funktion besitzt. Das *Pericardium serosum* besteht aus zwei Schichten (*Laminae*), von denen die *Lamina parietalis pericardii* mit der äußeren Schicht des Perikards verbunden ist und die *Lamina visceralis pericardii* – oder auch Epikard genannt – zum Myokard gerichtet ist. Zwischen den Schichten des *Pericardium serosum* befindet sich ein Spalt, die sog. Herzbeutelhöhle, die mit seröser Flüssigkeit gefüllt ist, um Reibungen zwischen den Laminae während der Kontraktionsphasen des Herzens zu minimieren. Diese Flüssigkeit wird von den kubischen Epithelzellen des *Pericardium serosum* sezerniert [185].

1.3.2. Dezellularisierungsprozess und Resultat

Die komplette Präparation der dezellularisierten EZM erfolgt durch Mitarbeiter der Auto Tissue Berlin GmbH. Das *Pericardium fibrosum* wird dabei zunächst vom restlichen Herzen getrennt und bei 4° C in einer Antibiotikalösung mit Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B gelagert. Die Dezellularisierung erfolgt durch eine Inkubation des Perikards in 1 %iger Deoxycholsäure-Lösung in PBS⁻ für 24 h. Reste der Detergenzien und Produkte der Zelllyse werden durch mehrmaliges Waschen mit PBS⁻ entfernt. Die Lagerung der dezellularisierten EZMs erfolgt für bis zu 18 Monate in der vorher beschriebenen Antibiotikalösung bei 4° C [186].

Als Resultat erhält man einen zellfreien Matrixpatch, dessen strukturelle und somit auch mechanische Eigenschaften gegenüber dem nativen Gewebe nicht-signifikant beeinflusst sind und der nach Herstellerangaben ausschließlich aus Kollagen und Elastin besteht [187]. Weiterhin wird angegeben, dass durch die Dezellularisierung alle lebenden Wirtszellen sowie etwaig vorhandene Bakterien, Viren, Pilze und Mykoplasmen abgetötet und weitestgehend eliminiert werden. Die Reduktion von DNA und RNA erfolgt zudem in einem Maße, dass eine Übertragung endogener Retroviren auf den Empfänger im Falle einer Transplantation der EZM (s. u.) ausgeschlossen ist [187].

1.3.3. Verwendung in der Chirurgie

Die dezellularisierte EZM wird seit mehr als zehn Jahren TÜV-zertifiziert unter dem Namen Matrix Patch[™] als Nahtmaterial zur Reparatur und Geweberekonstruktion in der Herz- und Gefäßchirurgie vertrieben [188]. Im Gegensatz zu konventionellen Patches, die mit Glutaraldehyd fixiert werden, weist die dezellularisierte EZM ähnliche mechanische Eigenschaften auf, hat aber die Vorteile der höheren mechanischen Flexibilität, einer geringeren Blutungsneigung aus Stichkanälen und einer fehlenden Neigung zur Calcium- und Fettakkumulation nach Transplantation [189]. Die größten Vorteile liegen jedoch in der geringeren immunologischen Abstoßung bedingt durch die Entfernung immunogener Komponenten auf der Matrix und in dem Potential, nach Transplantation von körpereigenen Zellen des Patienten besiedelt zu werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Transplantation des Matrix Patches[™] in die absteigende Aorta von Schafen sehr gut von den Versuchstieren angenommen wurde [190]. Neben einer schnellen Erholung sämtlicher Versuchstiere in Folge des Eingriffs, zeigte die histologische Analyse der Implantate vier Monate nach dem Eingriff, dass deren Integration in das Wirtsgewebe positiv verlaufen war. Die Matrix zeigte einen guten strukturellen Erhalt und keine Anzeichen von Degenerationen, aneurysmatischen Dilatationen oder von Kalzifizierung. Zudem war sie auf der luminalen Seite mit einem einschichtigen Endothel bedeckt und war in allen Schichten durch Fibroblasten infiltriert. Ähnliche Effekte sind demnach auch für Transplantate im Menschen zu erwarten.



Abb. 6: Dezellularisierung des Perikards und Verwendung der resultierenden extrazellulären Matrix. A) Das Perikard (P) fungiert im *in vivo* Kontext als Schutzschicht für das Herz vor äußeren Einflüssen und ermöglicht die Ausdehnung und Kontraktion des Myokards (M). B) Nach einer Dezellularisierung des equinen Perikards mit Deoxycholsäure resultiert der sog. Matrix PatchTM, bei dem es sich um die strukturell komplett erhaltene, zellfreie extrazelluläre Matrix (EZM) des Perikards handelt. C) Die EZM wird als Nahtmaterial in der Herz- und Gefäßchirurgie eingesetzt, wo es von Wirtszellen neu besiedelt wird. Die unteren Abbildungen stellen den Dezellularisierungs- und Besiedlungsprozess der EZM schematisch dar (Kugeln = Zellen). EN: Endokard; EP: Epikard. [190-192]

1.4. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau eines dreidimensionalen *in vitro* Zellkulturmodells für die Untersuchung von viralen Infektionen. Als Grundlage zur Herstellung dieses Modells dient eine dezellularisierte extrazelluläre Matrix, die von einem Kooperationspartner aus equinem Perikard generiert und zur Verfügung gestellt wird. Dreidimensionale Zellkulturmodelle wurden in den letzten Jahren bereits für einige Gewebe entwickelt und charakterisiert, wurden bisher aber nur in Ansätzen für Infektionsstudien eingesetzt. Durch die Verwendung von humanen Primärzellen in einem 3D-Zellkulturmodell können Erkenntnisse über den Infektionsverlauf im menschlichen Gewebe und über die Wechselwirkung zwischen Virus und Wirtszelle gewonnen werden. Diese Informationen können in einem klassischen Zell-Monolayer und/oder bei Verwendung von immortalisierten Zelllinien nicht generiert werden, da sich unter diesen Bedingungen sowohl die Zellmorphologie und -differenzierung als auch die Zell-Zell-Interaktionen deutlich von biologischen Geweben unterscheiden.

Im Rahmen der Doktorarbeit soll zunächst eine geeignete Methode zur Besiedlung des dezellularisierten Perikards mit geeigneten Zelllinien etabliert und optimiert und auf humane Primärzellen übertragen werden. Die daraus entwickelte 3D-Gewebekultur soll umfassend charakterisiert und für die Etablierung eines Infektionsmodells verwendet werden. Dieses Infektionsmodell soll genutzt werden, um die molekularen Mechanismen der Virusreplikation, die Weitergabe des Virus von Zelle zu Zelle und die Viruspathogenese von Orthopockenviren sowie die Wirtszellantwort in Folge der Infektion zu untersuchen. Zur weiteren Charakterisierung des 3D-Infektionsmodells sollen die erhaltenen Ergebnisse mit denen der korrespondierenden Monolayer-Infektionsversuche verglichen werden.

Sowohl die Charakterisierung der Differenzierung von Zellen im 3D-Verband als auch der Infektionsverlauf unter diesen Bedingungen sollen anhand von morphologischen Eigenschaften, Expressionsanalysen auf Nukleinsäureebene und Proteinexpressions-Analysen auf und -interaktionsebene erfolgen. Auf diese Weise sollen spezifische Interaktionen zwischen Virus und Wirtszelle, sowie zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen im Gewebeverband identifiziert werden, die für die Viruspathogenese von Bedeutung sind und die daher als mögliche Targets für antivirale Therapien in Frage kommen. Da sich im Rahmen meiner Diplomarbeit der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) als ein potenzielles Target herausgestellt hat, dessen spezifische Inhibition zu einem signifikanten Rückgang in der Ausbreitung von Orthopockenviren führte [87], ist die Identifizierung von Virus-induzierten, rezeptorabhängigen Signalwegen, die sowohl einen Einfluss auf die Viruspathogenese und -ausbreitung als auch auf die virale Inhibition der zellulären Abwehrmechanismen haben könnten, von besonderem Interesse.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Tab. 2: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blotting System Western Blot	TransBlot [®] TurboTM Transfer System	Bio-Rad Laboratories, München, D
Brutschrank	CB150	Binder, Tuttlingen, D
Brutschrank	Heracell Vios 160i	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Dipensierpipette	Handystep manual	Eppendorf, Hamburg, D
Dounce Homogenisator	Kimble Kontes 40 ml	Kimble Chase, Rockwood, USA
Elektronenmikroskop	Tecnai 12 Biotwin	FEI, Hilsboro, USA
Elektrophoresesystem	MiniProtean Tetracell System	Bio-Rad Laboratories, München, D
Feinwaage	RC 210P	Sartorius, Göttingen, D
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Fluorometer Nukleinsäurequantifizierung	Qubit 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Gefriergefäß	Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Gel Dokumentationssystem	ChemiDocTM MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories, München, D
Homogenisator	FastPrep-24	MP Biomedicals, Illkirch, F
Horizontalschüttler	Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, D
konfokales Laserscanningmikroskop	LSM 780 confocal microscope	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Kryomikrotom	Leica CM1950	Leica, Wetzlar, DE
Laborwaage	EW 620-3NM	Kern & Sohn, Balingen, D
Lichtmikroskope	Axiovert 40C; Invertoscope ID03; PrimoVert	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Magnetrührer	Stuart SB162	Sigma-Aldrich, München, D
Mikrotom	VT 1000 S	Leica, Wetzlar, D
Neubauer-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Laboroptik, Friedrichsdorf, D
NGS System	Illumina HiSeq 1500	Illumina, San Diego, USA
Pipetten	Research (10 µl; 20 µl, 100 µl; 200 µl; 1 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhelfer	Pipetboy Acu 2	Integra, Biebertal, D
Plattenlesegerät	Infinite M200 Pro	Tecan, Männedorf, CH
QC/Analyse Nukleinsäuren	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara, USA
qPCR System	ABI 7500 Fast Real-Time-PCR System	Life Technologies, Carlsbad, USA
Rotator	Test Tube Rotator L009-25	Kisker-Biotech, Steinfurt, D
Schüttelinkubator	Enviro-Genie	Scientific Industrie, Bohemia, USA
Spannungsquelle	EV 231	Consort bvba, Turnhout, BE
Spektrophotometer	NanoDrop 1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, D
Thermoschüttler	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozykler	PTC 200	MJ Research, Quebec, CA
Tischzentrifuge	Microcentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D
Transilluminator	Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Ultramikrotom	EM UC 7	Leica, Wetzlar, D
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 450	Branson Ultrasonics, Dietzenbach, D
Ultrazentrifuge	Optima XPN-100	Beckman Coulter, Brea, USA
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA, Staufen, D
Wasserbad	Туре 3043	Köttermann, Uetze/Hänigsen, D
Werkbank	HeraSafe KS/KSP	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, D

2.2. Enzyme

Tab. 3: Enzyme

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Ablösen adhärenter Zellen	Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe, D
cDNA-Synthese	MultiScribe Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Freisetzung von Nukleinsäuren	Proteinase K-Lösung	Macherey-Nagel, Düren, D
PCR und qPCR	Platinum Taq Polymerase	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.3. Verbrauchsmaterialien

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser	H878, 24x60 mm	Carl Roth, Karlsruhe, D
Einmalpinzetten	Aesculap nach Adson	B. Braun, Melsungen, D
Einmalskalpell	steril	Braun, Melsungen, D
Einmalspritzen	Inkjet 2ml/5ml/10ml	B. Braun, Melsungen, D
Fertiggele	Mini-PROTEAN [®] TGX [™] Precast Gels	Bio-Rad Laboratories, München, D
Folien für qPCR	MicroAmp [®] 96- & 384-Well Optical Adhesive Film	Life Technologies, Carlsbad, USA
Gewebestanze	Biospy Punch, 8 mm	Miltex, Viernheim, D
Glasflasche	Duran 100/500/1000 ml	Schott, Mainz, D
hydrophober Fettstift	ImmEdge Barrier Pen	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Kryoröhrchen	Cryo Tube Vials	NUNC, Roskilde, DK
Mikroschraubkappenröhrchen	2 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, D
Mikrozentrifugenröhrchen	0,1/0,5/1,5/2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Minifilter Zellkultur	Minisart Filter 0,2 μm	Sartorius, Göttingen, D
Objektträger	SuperFrost [®] Plus Gold Adhesion Microscope Slides	Gerhard Menzel, Braunschweig, D
Parafilm	Parafilm M	Pechiney, Chicago, USA
Petrischalen	60 mm; 100 mm	Greiner, Frickenhausen, D
Pinzetten	Pinzetten wiederverwendbar	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Pipettenspitzen	Eppendorf Tips	Eppendorf, Hamburg, D
Platten für qPCR	MicroAmp [®] Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad, USA
Probenröhrchen	2,5ml, PE	Carl Roth, Karlsruhe, D
Proteingele	Any kD [®] Mini-PROTEAN [®] TGX™ Gels, 10-well	Bio-Rad Laboratories, München, D
Serologische Pipettenspitzen	Einweg; 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml	TPP, Trasadingen, CH
Spitzen Dispenser	Combitips (5, 10ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Zellkulturflaschen	25, 75, 175 cm2 (T-25; T-75; T-175)	NUNC, Roskilde, DK
Zellkulturkammern	Nunc™ Lab-Tek™ II, 8-well	NUNC, Roskilde, DK
Zellkulturplatten	6, 12, 24, 48, 96 Wells	NUNC, Roskilde, DK
Zellkulturplatten Kollagen I	Collagen I, Coated Plate, 24 well	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Zellkulturplatten ULAP	Costar [®] 24 Well Plate, Ultra-Low Attachement Surface	Corning, NY, USA
Zellschaber	240/300 mm	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen	15, 50ml	VWR, Bruchsal, D
Zirkonium-Beads	Durchmesser: 1,44 mm, säuregewaschen	OPS Diagnostics, Lebanon, USA

2.4. Molekularbiologische Kits

Tab. 5: Molekularbiologische Kits

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	PCR-Purification Kit	Macherey-Nagel, Bethlehem, USA
cDNA-Synthese	TaqMan [®] Reverse Transcription Reagents	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
DNA-Extraktion aus Überständen	NucleoSpin [®] Tissue Kit	Macherey-Nagel, Bethlehem, USA
DNA-Verdau	Turbo DNA-free Kit	Ambion, Austin, USA
Herstellung von KGM-2 ready Medium	Keratinocyte Growth Medium 2 SupplementMix	Promocell, Heidelberg, D
Klonierung und Transfomation	TOPO [®] TA Cloning [®] Kit K4500-40	Life Technologies, Carlsbad, USA
NGS Library Prep	TruSeq RNA Library Preparation Kit v2	Illumina, San Diego, USA
NGS Library Quantifizierung	KAPA Library Quantification Kit	Kapa Biosystems, Wilmington, USA
NGS Sequenzierungchemie	TruSeq Rapid SBS Kit v1	Illumina, San Diego, USA
Plasmidpräparation	PureLink [®] Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Primärzellpassagierung	Detach Kit	Promocell, Heidelberg, D
qPCR	Invitrogen Platinum Taq DNA Polymerase Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
RNA-Extraktion aus Zelllysaten	RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
RNA-Qualitätsbestimmung	total RNA RNA 6000 Pico Kit	Agilent, Santa Clara, USA
RNA-Quantifizierung	Qubit [®] RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Viabilitätsbestimmung	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
Western Blot	Trans-Blot TurboRTA Mini PVDF Transfer Kit	Bio-Rad Laboratories, München, D

2.5. Reagenzien

Tab. 6: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, D
Bleicitrat	Merck, Darmstadt, D
Borax	Sigma-Aldrich, München, D
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Carboxy-Methyl-Cellulose (CMC)	Fluka, Buchs, CH
CF594 Wheat Germ Agglutinin	Biotium, Hayward, USA
Cryo-SFM Gefriermedium	Promocell, Heidelberg, D
Dithiothreitol	Carl Roth, Karlsruhe, D
DMEM	Life Technologies, Carlsbad, USA
DMSO	Serva, Heidelberg, D
dNTP-Mix, 2,5 mM/25 mM	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
ECGM Supplement Mix	Promocell, Heidelberg, D
Eisessig	Sigma-Aldrich, München, D
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	Promocell, Heidelberg, D
Epon (812)	Serva, Heidelberg, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
FKS	PAA, Cölbe, D
Fluoroshield Mounting Medium	Sigma-Aldrich, München, D
Formaldehyd-Lösung (37%)	Merck, Darmstadt, D
Gefitinib	Selleck Chemicals, München, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
HEPES	Merck, Darmstadt, D
Keratinocyte Growth Medium 2 (KGM2)	Promocell, Heidelberg, D
KGM 2 Supplements	Promocell, Heidelberg, D
L-Glutaminlösung (200 mM)	Life Technologies, Carlsbad, USA
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, München, D
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid-Lösung	Bioline, Luckenwalde, D
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Naphtol Blue Black	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München, D
NEAA	Gibco BRL, Eggenstein, D
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt, D
Page Blue Protein Staining Solution	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
PCR-Puffer 10 X, Tag DNA Polymerase PCR buffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, D
Probenpuffer DNA (Gel Loading Dye 6X)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Probenpuffer Proteine (5X Lanemarker)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Proteinmarker PageRuler Prestained Plus	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
RIPA-Puffer	Alfa Aesar, Heysham, UK
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, D
Substrat SuperSignal West Dura Extended Duration	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Tanninsäure	Merck, Darmstadt, D
TGS Running Buffer Page	Bio-Rad Laboratories, München, D
Tissue-Tek O.C.T. Einbettmedium	Sakura, Staufen, D
Toluidinblau	Merck, Darmstadt, D
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, D
Tween20	Carl Roth, Karlsruhe, D
Uranylacetat	Merck, Darmstadt, D
Western Blot Stripping Puffer Restore PLUS	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D

2.6. qPCR Assays

Die Forward (F) und Reverse (R) Primer sowie die Sonden (S) in der folgenden Tabelle wurden synthetisiert durch TIB Molbiol, Berlin, Deutschland.

Tab. 7. IIILEITIE ur CIV-Assavs	Tab.	7:	Interne	aPCR-Assav	/s
---------------------------------	------	----	---------	------------	----

Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
c-MYC F	gCCAgAggAggAACgAgCT	humanes Referenzgen
c-MYC R	gggCCTTTTCATTgTTTTCCA	Zellzahlbestimmung
c-MYC S	FAM-TgCCCTgCgTgACCAgATCC	
TBP F	TTCggAgAgTTCTgggATTgTA	humanes Referenzgen
TBP R	TggACTgTTCTTCACTCTTggC	
TBP S	FAM-CCgTggTTCgTggCTCTCTTATCCTCAT	
GAPDH F	gAAggTgAAggTCggAgTC	humanes Referenzgen
GAPDH R	gAAgATggTgATgggATTTC	
GAPDH S	FAM- CAAgCTTCCCgTTCTCAgCCT	
KI-67 F	ggAgAAgCCCCAACCAAAAg	Proliferationsbestimmung
KI-67 R	TAggACTAggAgCTggAggg	
KI-67 S	FAM-TCTggTAATgCACACTCCACCTgTCCTgA	
Pox I7L F (P4A F)	TAATACTTCgATTGCTCATCCAgg	späte virale Transkription
Pox I7L R (P4A R)	ACTTCTCACAAATggATTTgAAAATC	Bestimmung viraler GE
Pox I7L S (P4A S)	FAM- TCCTTTACgTgATAAATCAT-MGB	
Pox CGF F	CggTgACTgTATCCACgCTAgAg	frühe virale Transkription
Pox CGF R	AgCACAATACCKggAgATgggA	
Pox CGF S	FAM-CTACTAATACTAYATgCTgACATC-MGB	

Tab. 8: Kommerzielle qPCR-Assays

Zielgen	Produktnummer	Hersteller
CASP14	Hs00201637_m1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
CALML5	Hs00249968_s1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
RNASE7	Hs02378229_s1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
DSC1	Hs00245189_m1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
IL1R2	Hs01030384_m1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
MAT2A	Hs01553621_g1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
MIR22HG	Hs00993773_g1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
DGCR8	Hs00256062_m1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
HSPA1B	Hs01040501_sH	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
DDIT3	Hs00358796_g1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D

2.7. Eukaryotische Zellen und Zellkulturmedien

Zellen	Spezies	Zellart	Zelltyp	Quelle	Kultivierungsmedium
Vero E6	Chlorocebus sp.	Zelllinie	Epithel	ATCC, #CRL-1586	D-MEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin
HaCat	Homo Sapiens	Zelllinie	Epithel	CLS #300493	D-MEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin
HEp2	Homo Sapiens	Zelllinie	Epithel	ATCC #CCL-23	D-MEM, 5% FKS, 2 mM L-Glutamin
NHDF	Homo Sapiens	Primärzelle	Fibroblast	Promocell, C-12350	D-MEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 1% NEAA
HUVEC	Homo Sapiens	Primärzelle	Endothel	Promocell, C-12253	ECGM, ECGM Supplement Mix
NHEK	Homo Sapiens	Primärzelle	Epithel	Promocell, C-12007	KGM2, KGM2 Supplement Mix
		optional für Differenzierung der NHEK:			+ 1,92 mM CaCl2

Tab. 9: Eukaryotische Zellen und Zellkulturmedien
2.8. Sonstige biologische Agenzien

Verwendetes Virus:

Die Infektionsversuche wurden mit dem Kuhpockenvirus CPXV BAC pBRf durchgeführt. Dieses Virus wurde freundlicherweise von Swaantje Roth und Dr. Karsten Tischer (Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, D) zur Verfügung gestellt. Es enthält das gesamte Genom des CPXV-Stamms *Brighton Red* (ATCC, #VR-302). Zusätzlich wurde eine mini-F-Sequenz und ein GFP-Gen unter Kontrolle eines späten viralen Promotors in das Virusgenom integriert [193]. Das rekombinante Virus ist von seinen Wachstumseigenschaften und seiner genetischer Stabilität nahezu identisch zum Wildtypvirus. Durch die GFP-Expression in der infizierten Zelle ist die Nachweisbarkeit und Verfolgbarkeit der Infektionen mittels Fluoreszenzmikroskopie gegenüber dem Wildtypvirus stark vereinfacht.

Verwendete extrazelluläre Matrix zur 3D-Zellkultur Generierung:

Dezellularisiertes equines Perikard wurde von der Auto Tissue GmbH bezogen (Produktname Matrix Patch[™]) und als biologische extrazelluläre Matrix (EZM) für die Generierung von 3D-Zellkulturmodellen verwendet. Die Dezellularisierung erfolgt durch eine mehrstufige Behandlung des Perikards mit Deoxycholsäure [186]. Die Matrix Patches sind glutaraldehyd- und endotoxinfrei und werden seit mehreren Jahren in der Gefäß- und Herzchirurgie als Nahtmaterial eingesetzt [190]. Die dezellularisierten Matrizes sind in PBS⁻ mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin und dem Antimykotikum Amphotericin bei 4° C für mehrere Monate lagerfähig.

2.9. Antikörper

Tab. 10: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Produktnummer	Quelle
aPKC	Kaninchen	sc-208	Santa Cruz, Dallas, USA
Beta Actin	Kaninchen	#4967	Cell Signalling, Cambridge, UK
Caspase-14	Kaninchen	ab45415	Abcam, Cambridge, UK
cleaved PARP	Kaninchen	ab32064	Abcam, Cambridge, UK
CPXV A33	Kaninchen		Nitsche + Stern, RKI
Cytokeratin 10	Maus	ab20208	Abcam, Cambridge, UK
Cytokeratin 14	Huhn	ab130102	Abcam, Cambridge, UK
EGFR	Kaninchen	ab52894	Abcam, Cambridge, UK
EGFR-P	Kaninchen	ab40815	Abcam, Cambridge, UK
Fibronectin	Kaninchen	ab2413	Abcam, Cambridge, UK
Hsp70	Kaninchen	ab181606	Abcam, Cambridge, UK
IL1R2	Kaninchen	ab97388	Abcam, Cambridge, UK
Integrin Beta1	Maus	ab30388	Abcam, Cambridge, UK
Involucrin	Kaninchen	ab53112	Abcam, Cambridge, UK
KI-67	Kaninchen	ab16667	Abcam, Cambridge, UK
Kollagen 4	Kaninchen	ab6586	Abcam, Cambridge, UK
Laminin	Kaninchen	ab11575	Abcam, Cambridge, UK
MMP1	Kaninchen	ab38929	Abcam, Cambridge, UK
NR4A1	Kaninchen	ab48789	Abcam, Cambridge, UK
PCNA	Maus	ab29	Abcam, Cambridge, UK
PUMA	Kaninchen	ab33906	Abcam, Cambridge, UK
Ribonuclease 7	Maus	ab154143	Abcam, Cambridge, UK

Material und Methoden

Tab. 11: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Produktnummer	Quelle
Anti-Huhn-FITC	Ziege	ab46969	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Kaninchen-AF647	Ziege	#4414	Cell Signalling, Cambridge, UK
Anti-Kaninchen-FITC	Ziege	111-095-144	Dianova, Hamburg D
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	#7074	Cell Signalling, Cambridge, UK
Anti-Maus-AF647	Ziege	#4410	Cell Signalling, Cambridge, UK
Anti-Maus-FITC	Ziege	115-095-003	Dianova, Hamburg D
Anti-Maus-HRP	Ziege	ab97023	Abcam, Cambridge, UK

2.10. Software

Tab. 12: Software

Verwendung	Name	Hersteller/Quelle
Bildbearbeitung	Picture Manager 2010	Microsoft, Unterschleißheim, D
Datenauswertung	Graph Pad Prism 5.04	GraphPad Software, San Diego, USA
GO-Term Analyse	BiNGO 3.0.3 for Cytoscape	Maere et al., 2005
Heatmap Generierung	CIMminer	NIH, Bethesda, USA
Literaturverwaltung	EndNote Web Edition	Thomson Reuters, New York, USA
Lumineszenzmessung	iControl	Tecan, Männedorf, CH
Mapping von Nukleinsäuren	NCBI Blast	NCBI, Bethesda, USA
Mapping von Nukleinsäuren	UCSC Genome Bioinformatics	UCSC, Santa Cruz, US
Mikroskopie cLSM	ZEN 2012 (blue edition)	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Mikroskopie konventionell	AxioVision LE 4.8.2	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Molekulare Analysen	Cytoscape 3.2.1.	Institute of Systems Biology, Seattle, USA
NGS Steuerung	Illumina HiSeq Control Software 2.2.	Illumina, San Diego, USA
Nukleinsäureanalytik	Geneious 10.0.5	Geneious, Auckland, NZ
Nukleinsäurequantifizierung	QuBit Firmware 3.11	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Nukleinsäurequantifizierung	NanoDrop 1000 3.8.1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Oligonukleotid Analyse	OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Technologies, Coralville, USA
Präsentationen	Powerpoint 2010	Microsoft, Unterschleißheim, D
Primer Design	Primer3web 4.0.0	Koresaar et al., 2007
QC/Analyse Nukleinsäuren	Agilent 2100 Expert	Agilent, Santa Clara, USA
qPCR Auswertung	Applied Biosystems 7500 Software v2.3	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tabellenkalkulation	Excel 2010	Microsoft, Unterschleißheim, D
Textbearbeitung	Word 2010	Microsoft, Unterschleißheim, D
Transkriptomanalysen	Partek Flow	Partek Inc, St.Louis, USA
Western Blot Auswertung	Image Lab 5.2.1	Bio-Rad Laboratories, München, D

2.11. Puffer und Lösungen

Tab. 13: Puffer und Lösungen

Name	Grundlage	Zusätze/pH
Blockierlösung Western Blot	PBS-T	4% Magermilchpulver
IFA Verdünnungspuffer	PBS	2% BSA 0,1% NaN ₃
Klinikfixans	0,05 M HEPES	1% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd; pH 7,2
Naphtalen Blue Black Lösung	bidestilliertes Wasser	1 g Naphtol Blue Black, 13,6 g Natriumacetat, 60 ml Eisessig pro 1 L
Paraformaldehyd-Lösung	PBS	4% Paraformaldehyd; pH 7,2
PBS "ohne" (PBS ⁻)	bidestilliertes Wasser	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na $_2$ HPO $_{4,}$ 0,24 g KH $_2$ PO4 pro 1 L; pH 7,2
PBS-T Waschpuffer Western Blot	PBS	0,1% Tween20
Permeabilisierungs-Lösung IHC/IFA	PBS	0,2% Triton-X100
Saccharose-Lösung 15%	PBS	15% Saccharose
Saccharose-Lösung 30%	PBS	30% Saccharose
Saccharose-Lösung 37%	PBS	37% Saccharose
TGS Laufpuffer 1 X SDS-PAGE	10 X TGS Laufpuffer (Bio-Rad)	900 ml bidestilliertes Wasser pro 1 L 1 X Laufpuffer
Transferpuffer 1 X Western Blot	5 X Transferpuffer (Bio-Rad)	600 ml bidestilliertes Wasser, 200 ml EtOH pro 1 L 1 X Transferpuffer
Tris-HCl Lösung	bidestilliertes Wasser	1 mM Tris-HCl, pH 9,0
Überschichtungsmedium Plaquetest	Kultivierungsmedium Vero E6	1,6 g CMC pro 100 ml; pH 7,4
WGA Färbelösung	IFA Verdünnungspuffer	2,5 μl CF594-WGA pro 1 ml

2.12. Zytologische Methoden

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank der Klasse II in einem S2-Labor durchgeführt. Während des Kultivierungszeitraums wurde eine strenge räumliche Trennung von infizierten und nicht infizierten Kulturen eingehalten.

2.12.1. Zellen passagieren in Monolayer-Kultur

Adhärent wachsende primäre humane Zellen oder Zelllinien wurden je nach Flaschengröße $(25 \text{ cm}^2, 75 \text{ cm}^2, 175 \text{ cm}^2)$ in 8 ml, 20 ml oder 40 ml des entsprechenden Mediums bei 37° C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit (Standardkultivierungsbedingungen) kultiviert. Bei Erreichen eines Konfluenzgrades von 80 - 90 % erfolgte die Passagierung der Zellen, um die Induktion von Zellkontakthemmungen zu unterbinden, was unter anderem ein verlangsamtes Proliferationsverhalten der Zellen zur Folge hätte. Zudem sollte somit die Induktion von etwaigen Differenzierungsprozessen verhindert werden, die bei bestimmten Zelltypen bei überkonfluenten Zuständen eingeleitet werden können. NHEK-Zellen wurden mit dem DetachKit (PromoCell) gemäß dem Standardprotokoll gewaschen, trypsiniert und neutralisiert. Alle weiteren verwendeten Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS⁻ durch 5-minütige Behandlung mit Trypsin/EDTA unter Standardinkubationsbedingungen abgelöst und anschließend in neues Wachstumsmedium überführt, was die Inaktivierung des Trypsins durch die Serumbestandteile des Mediums zur Folge hat. Nach der Sedimentation der Zellen (400 × g, 5 min) und der Aufnahme in frisches Wachstumsmedium, wurden die Zellen je nach Planung in unterschiedlicher Verdünnung erneut in Kultur genommen.

2.12.2. Zellen zählen und aussäen für Monolayer-Kultivierung

Abgelöste, sedimentierte und neu aufgenommene Zellen wurden für Versuche in definierten Konzentrationen in Zellkulturplatten ausgesät. Hierfür wurde zunächst die Zellkonzentration mit einer Neubauerkammer bestimmt und die gewünschten Konzentrationen in Wachstumsmedium eingestellt. Je nach Fragestellung wurden die Zellen in 24 oder 48 Well Platten in einem Volumen von 500 µl bzw. 250 µl mit einer Konzentration von 1 x 10^5 Zellen/ml ausgesät. Für Immunfluoreszenz-fragestellungen wurden 8 Well Zellkulturkammern (Lab-Tek[™] II, Nunc) verwendet und pro Well 250 µl einer Verdünnung von 1 x 10^5 Zellen/ml eingesetzt. Nach 72 h Äquilibrierungszeit wurden die Präparate behandelt oder infiziert.

2.12.3. Zellen auftauen und einfrieren

Zum Zwecke der Kryokonservierung wurden Monolayer-kultivierte Zellen bei Erreichen eines Konfluenzgrades zwischen 80 und 90 % gewaschen, abgelöst, sedimentiert (siehe 2.12.1) und in Serum-freiem Cryo-SFM Einfriermedium (PromoCell) in Konzentrationen von 1 x 10^6 bis 3 x 10^6 Zellen/ml aufgenommen. Nach der Überführung von je 1 ml in Kryoschraubgefäße wurden die Zellen mit einem Temperaturgradienten von 1° C pro Minute (Mr. Frosty, Nalgene) bei -80° C eingefroren und anschließend in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Rekultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37° C für 2 min aufgetaut und in frischem Medium aufgenommen. Um zytotoxische Reste des Einfriermediums (u. a. DMSO) zu entfernen, wurden die Zellen sedimentiert (400 × g, 5 min), in Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen unter Wachstumsbedingungen kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein kompletter Mediumwechsel.

2.12.4. Präparation der Matrix für 3D-Kultivierungen

Die Langzeit-Lagerung der verwendeten equinen, perikardialen extrazellulären Matrizes erfolgte in PBS⁻ mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin und dem Antimykotikum Amphotericin.

Die zu präparierende Matrix wurde unter sterilen Bedingungen mit Pinzetten aus dem Lagermedium entnommen und auf einer Petrischale ausgebreitet. Um eine Austrocknung und somit etwaige Strukturveränderungen der Matrix zu verhindern bzw. Reste des Lagermediums zu entfernen, die u. U. die Kultivierung der Präparate stören könnten, wurde die Matrix großzügig mit Wachstumsmedium überdeckt. Mit sterilen Einmal-Biopsiestanzen wurden Stücke von 8 mm Durchmesser ausgestanzt, wobei eine Stanze für etwa fünf bis zehn Präparate verwendet werden konnte. Die Überführung der ausgestanzten Stücke in 48 Well Standard-Polystyrenplatten oder 24 Well *Ultra Low Attachment Plates* (ULAP; Corning) erfolgte mit sterilen Pinzetten. Um einer Zusammenfaltung der ausgestanzten Matrixstücken im Well entgegenzuwirken bzw. eine leichte Ausbreitung zu fördern, wurden vor dem Transfer der Stücke die für die Kultivierung vorgesehenen Wells der Zellkulturplatten mit 500 µl Medium befüllt (Abb. 7).

2.12.5. Vorinkubation und Repopulation der Matrix für 3D-Kultivierungen

Die Vorkultivierung der Matrixstücken in Medium erfolgte für mindestens 24 h, um weitere Reste des Lagermediums zu entfernen und die Matrix auf die verwendete Medienzusammensetzung und Temperatur zu äquilibrieren. Für die Repopulation wurden abgelöste, sedimentierte und in frisches Medium aufgenommene Zellen (siehe 2.12.1) aus einer Standard Monolayer-Kultivierung auf definierte Konzentrationen verdünnt (i. d. R. 2 x 10^5 /ml). Das Präkultivierungsmedium wurde aus den Wells entfernt und 500 µl der Zellverdünnung auf der Matrix ausgesät.

Die Aussat erfolgte mit äußerster Vorsicht zentral auf die Matrix, da diese sehr anfällig für Mediumstrom-bedingte Turbulenzen ist. Die Kultivierungsplatten wurden vorsichtig in den Inkubator transferiert.



Abb. 7: Präparation von Perikard-basierten 3D-Zellkulturen in Ultra-Low Attachement Plates. Unter sterilen Bedingungen wurden dezellularisierte Perikard-Patches™ mit Pinzetten aus der Lagerlösung entnommen und in Petrischalen ausgebreitet (A). Mit Biopsiestanzen wurden Scheiben von 8 mm Durchmesser ausgestanzt (B) und mit Pinzetten in mit Kultivierungsmedium gefüllte 24 Well Ultra-Low Attachement Plates überführt (C). Nach einer Äquilibrierungszeit von 24 h wurde das Medium entfernt und trypsinierte Zellen auf die Matrix gegeben. Nicht-adhärente Zellen wurden nach 24 h von den Präparaten durch Mediumwechsel getrennt. Ein Mediumwechsel während der weiteren Kultivierungszeit erfolgte alle 48 bis 72 h.

2.12.6. Zellkultivierung der 3D-Präparate in Polystyrenplatten

Bei Verwendung von 48 Well-Polystyrenplatten für die Repopulation wurden die Präparate nach 24 h Inkubation unter Standardkultivierungsbedingungen vorsichtig mit sterilen Pinzetten aus der Platte entfernt und in neue 24 Well Platten transferiert, um sie von adhärent wachsenden Zellen auf dem Boden der Kulturplatten zu separieren, die eine Verfälschung der Kultivierung zur Folge hätten. In den für die Kultivierung vorgesehenen Wells wurden 2 ml Wachstumsmedium vorgelegt, um eine ungestörte Ausbreitung der Präparate in den Wells zu unterstützen. Die Orientierung der Präparate musste unbedingt eingehalten werden, da sonst die Mediumversorgung der auf der Oberfläche der Matrix wachsenden Zellen suboptimal wäre und es somit zum Untergang der Kultur kommen könnte. Die Weiterkultivierung erfolgte für mindestens 48 h. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, da die dreidimensional wachsenden Zellen die zur Verfügung stehenden Mediumbestandteile schneller als in Monolayer-Kulturen verbrauchen. Es wurde nur die Hälfte des Mediums jedes Präparats gewechselt, um das biochemische Milieu, welches die Zellen während der Kultivierung erzeugten, nicht zu stören. Aufgrund der nicht-fixierten Lage der Präparate in den Kultivierungsplatten erfolgte die Zugabe des Mediums vorsichtig und zentral auf die Matrix, um Turbulenzen vorzubeugen, die möglicherweise eine versehentliche Änderung der Orientierung und somit eine unzureichende Versorgung der auf der Oberfläche angesiedelten Zellen zur Folge gehabt hätten. Die Vorkultivierungszeit der Präparate vor dem Einsetzen in die Versuche betrug zwischen fünf und sieben Tage.

2.12.7. Zellkultivierung der 3D-Präparate auf Ultra Low Attachement Plates (ULAP)

Bei Verwendung von 24 Well ULAP zur Repopulation der Matrix wurde nach 24 h Inkubation unter Standardkultivierungsbedingungen das komplette Medium inklusive nicht-adhärenter Zellen abgenommen und durch 2 ml frisches Wachstumsmedium unter vorsichtiger und zentral auf das Präparat gerichteter Zugabe ersetzt. Ein Plattenwechsel entfiel, da eine Adhärenz der Zellen auf dem Wellboden der ULAP nicht möglich war und das Wachstum der Zellen somit auf die Matrix konzentriert war. Die Benutzung von ULAP für die Präparat-Generierung barg somit eine geringere Gefahr einer versehentlichen Veränderung der Orientierung der Präparate während der Kultivierung.

Der Mediumwechsel erfolgte analog zu 2.12.6.

2.12.8. Zellkultivierung auf Kollagen I-beschichteten Zellkulturplatten

Die Kultivierung von Vero E6-Zellen bzw. primären humanen Keratinozyten (NHEK) in Kollagen Ibeschichteten 24 Well Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific) erfolgte entsprechend der Monolayer-Kultivierung der jeweiligen Zellen in Standard 24 Well Zellkulturplatten (siehe 2.12.1).

2.13. Virologische Methoden

2.13.1. Virusanzucht

Die Anzucht von CPXV erfolgte auf HEp2-Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert und vier Tage unter Standardkultivierungsbedingungen inkubiert. Der Infektionsgrad der Zellen wurde durch mikroskopische Beurteilung des zytopathischen Effekts (CPEs) beurteilt. Bei Erreichen eines CPE von etwa 50% wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Wellboden abgelöst, in Zentrifugenröhrchen transferiert und pelletiert (5 min, 1800 x g, 4° C). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets wurden in 1 ml einer 10 mM Tris-HCl-Lösung (pH 9,0) aufgenommen und mit einem sterilem Dounce Homogenisator aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4° C) abgetrennt und der virushaltige Überstand mit Ultraschall aufgeschlossen.

2.13.2. Virusaufreinigung

Für die Aufkonzentrierung des Virusstocks bzw. für die Entfernung von Zelltrümmern und biologisch aktiven Faktoren wie Zytokinen aus den Viruspräparationen wurde eine Aufreinigung durch Zentrifugation durch ein Saccharosekissen angeschlossen. 17 ml einer 37 %igen Saccharose-Lösung (0,45 µm sterilfiltriert) wurden in *SW28* Ultrazentrifugen-Röhrchen (BD Bioscience) vorgelegt und mit der Virussuspension auf 25 ml Endvolumen aufgefüllt.

Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 33.000 x g bei 4° C für 80 min. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Virus-Pellet wurde in 1 ml einer 1 mM Tris-HCl-Lösung (pH 9,0) resuspendiert. Die Virussuspension wurde mit Ultraschall behandelt, aliquotiert und bei -80° C gelagert. Der Titer wurde mittels Plaquetitrationsassay bestimmt (siehe 2.13.3).

2.13.3. Plaquetitrationsassay

Zur Bestimmung des Virustiters wurde ein Plaquetitrationsassay durchgeführt. Hierbei wurden die entstehenden zellfreien Regionen, sogenannte Plaques, in einem konfluenten Zellrasen nachgewiesen. Jeder Plaque kann einer einzelnen infektiösen Einheit zugeordnet werden, wodurch dann der Titer bestimmt werden kann.

1 x 10⁵ Vero E6-Zellen wurden pro Well einer 24-Well Zellkulturplatte in 500 μl Zellkulturmedium ausgesät und für 24h unter Standardkultivierungsbedingungen inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch 200μl frisches Medium ersetzt. Von den zu testenden Fluiden wurden dekadische Verdünnungsreihen angefertigt und jeweils 200 μl der Verdünnungen in Mehrfachansätzen in die Wells gegeben. Nach 4 h Inkubation wurden die Zellen mit je 400 μl 1,6 %iger Carboxymethylcellulose (CMC) überschichtet und für weitere vier Tage unter Kultivierungsbedingungen inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und es folgte eine Zellfixierung und Virusinaktivierung mit 4 % Formaldehydlösung. Nach 20-minütiger Färbung mit 0,1 % Naphthol(blau)schwarz Färbelösung wurden die Zellen zwei Mal mit Leitungswasser gewaschen und es wurden die ungefärbten Plaques im gefärbten Zellrasen ausgezählt. Die Berechnung des Titers erfolgte durch die Multiplikation der ausgezählten Plaques mit der jeweiligen Verdünnungsstufe.

2.13.4. Quantifizierung viraler DNA

Zusätzlich zur Bestimmung der Konzentration infektiöser Einheiten wurden auch virale Genomäquivalente aus Zellkulturüberständen und Zelllysaten quantifiziert, um eine Aussage über den Grad der Reifung von GE zu infektiösen Einheiten treffen zu können. Die Bestimmung erfolgte über eine qPCR (siehe 2.15.3) mit dem Orthopockenvirus-generischen Assay P4A (siehe 2.6).

2.13.5. Infektion von Monolayer-Kulturen für Versuche

Für Monolayer Infektionsversuche wurden die Zellen gemäß 2.12.1 nach der Vorkultivierung in Zellkulturflaschen gewaschen und trypsiniert und wurden gemäß 2.12.2 in Zellkulturplatten verschiedener Größen ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium der Zellen komplett abgenommen und es wurde ein halbes Volumen frisches Kultivierungsmedium in jedes Well gegeben (z. B. 24 Well: 500 μ l Kultivierungsvolumen \rightarrow 250 μ l frisches Medium).

In Mikrozentrifugenröhrchen wurden mit dem jeweiligen Zellkulturmedium Verdünnungen des verwendeten Virus je nach Zellzahl und gewünschter Anzahl infektiöser Einheiten (*plaque forming units*, PFU) pro Zelle (*multiplicity of infection*, MOI) hergestellt. Die Infektion der Zellen erfolgte mit einem halben Kultivierungsvolumen der hergestellten Virussuspension (z. B. 24 Well: 250 µl). Um den Einfluss eventuell vorhandener biologischer Faktoren aus dem Virusstock auf die Kultivierungsbedingungen abgenommen und die Zellen mit PBS⁻ gewaschen. Nach der Zugabe eines Kultivierungsvolumens (z. B. 24 Well: 500 µl) des jeweiligen Zellkulturmediums wurden die Zellen bis zur Abnahme oder zum Mediumwechsel unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Um über den gesamten Versuchszeitraum eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten und gleichzeitig nicht das durch die Zellen aufgebaute biochemische Milieu massiv zu beeinträchtigen, wurde das Kultivierungsmedium alle 48 h zur Hälfte gewechselt.

2.13.6. Infektion von 3D Kulturen für Versuche

Für Infektionsversuche mit 3D Kulturen wurden die Präparate gemäß 2.12.4 – 2.12.7 generiert und vorkultiviert. Nach sieben Tagen wurde das Medium der Zellen abgenommen und durch 250 μ l frisches Kultivierungsmedium ersetzt. Im jeweiligen Kultivierungsmedium wurden Verdünnungen des verwendeten Virus je nach Zellzahl und gewünschter MOI hergestellt. Zu den Zellkulturen wurden jeweils 250 μ l der Virussuspension gegeben und analog zu 2.13.5 nach 4 h wieder entfernt. Nach einem Waschschritt mit 500 μ l PBS⁻ wurden 2 ml frisches Kultivierungsmedium zu den Zellen gegeben und die Kulturen wurden unter Standardkultivierungsbedingungen bis zum gewünschten Abnahmezeitpunkt oder zum Mediumwechsel inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte an den Folgetagen analog zur Monolayer-Infektion. Die Zugabe des Mediums erfolgte vorsichtig und zentral auf das Präparat gerichtet.

2.14. Nukleinsäure-Präparation

2.14.1. DNA-Extraktion aus Überständen

Die Extraktion der viralen DNA aus Zellkulturüberständen erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Tissue Kit (Macherey-Nagel) nach dem Standardprotokoll. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20° C.

2.14.2. DNA/RNA-Extraktion aus Zelllysaten

Die Aufreinigung von Gesamt-Nukleinsäuren aus Zelllysaten erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) abweichend vom Standardprotokoll "Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology" mit nachfolgenden Modifikationen.

Im Monolayer kultivierte Zellen wurden nach einem Waschschritt mit PBS⁻ in 350 µl RLT-Puffer + 1 % ß-Mercaptoethanol aufgenommen und für 3 min bei RT in der Zellkulturplatte inkubiert. Nach mehrmaligem Resuspendieren mittels Pipette wurden die Lysate in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bis zur Aufreinigung bei -80° C gelagert. Unmittelbar vor der Aufreinigung wurden die Lysate auf Eis aufgetaut.

3D-Zellkulturen wurden nach Beendigung der Kultivierung zu Waschzwecken mit einer Pinzette nacheinander durch zwei mit PBS⁻ gefüllte 50 ml Zentrifugengefäße gezogen, in 2 ml Mikroschraubröhrchen mit 700 μ l RLT-Puffer + 1 % ß-Mercaptoethanol und ca. 20 sterilen Zirkoniumkügelchen (OPS Diagnostics) überführt und bis zur Aufreinigung bei -80° C gelagert. Vor der Aufreinigung wurden die 3D Zellkulturlysate auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem Homogenisator FastPrep-24 (MP Biomedicals) zweimal homogenisiert (6 m/s, 20 s).

Sowohl die 2D als auch die 3D RLT-Lysate wurden direkt vor der Aufreinigung für 10 s auf dem Vortexter durchmischt und anschließend anzentrifugiert. Jeweils 350 µl der Lysate wurden für die Extraktion verwendet. Der weitere Verlauf der Extraktion erfolgte gemäß Standardprotokoll ab Punkt 4. Die Elution der Gesamt-Nukleinsäuren (Punkt 11) erfolgte in 80 µl RNase-freiem Wasser. 54 µl des Eluats wurden für die weitere Prozessierung der RNA genutzt (siehe 2.14.3 + 2.14.4), das restliche Volumen wurde bei -20° C gelagert und später für die Bestimmung zellulärer und viraler Genomäquivalente mittels qPCR verwendet (siehe 2.13.4).

2.14.3. DNase-Verdau

Um zelluläre und virale DNA aus den Eluaten zu entfernen und somit eine reine RNA Fraktion zu erhalten, wurde ein DNase-Verdau mit jeweils 2 U der TURBO DNase (Ambion) nach Standardprotokoll für 20 min bei 37° C durchgeführt. Die Lagerung der RNA erfolgte anschließend auf Eis (Kurzzeit) oder bei -80° C (Langzeit).

2.14.4. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Oligo-dT Primern und der MultiScribe[™] MuLV reversen Transkriptase (Invitrogen) unter Standardbedingungen. Für jeden Synthese-Ansatz wurde ein Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase angesetzt, um eventuell verbliebene DNA-Kontaminanten identifizieren zu können. Die cDNA wurde im Anschluss bis zur qPCR bei -20° C gelagert.

2.14.5. Konzentrationsbestimmung gelöster Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration der Eluate wurde spektralphotometrisch mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) über die Absorption bei 260 nm bestimmt (1 $OD_{260} = 50 \mu g/ml$ für DNA bzw. 44 $\mu g/ml$ für RNA). Die Ermittlung der Reinheit erfolgte über die Quotientenbildung der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm.

Für die NGS-basierte Transkriptomanalyse (siehe 2.18) wurde die Konzentration der RNA über den Qubit 2.0 (Invitrogen) mit dem Qubit RNA HS Assay Kit gemäß Standardprotokoll bestimmt. Diese Quantifizierungsmethode liefert erfahrungsgemäß genauere Daten als die Konzentrationsbestimmung über den NanoDrop.

2.14.6. Bestimmung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer

Zur Bestimmung der Qualität der aufgereinigten RNAs wurde der RNA Integritätsindex (RIN) mit dem RNA 6000 Pico Total RNA Kit (Agilent) auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung der zu analysierenden RNAs und der anschließenden Intensitätsanalyse der resultierenden Banden. Das Verhältnis der Intensität der ribosomalen RNAs zur Gesamtintensität aller Nukleinsäuren auf dem Gel gibt Aufschluss über den Grad der Degradierung aller RNAs. Je höher der von der Software ausgegebene RIN-Wert (Range von 1 bis 10), desto besser die Integrität der RNAs. Das Vorgehen der Messung erfolgte gemäß Standardprotokoll.

2.15. Nukleinsäure-Analytik

2.15.1. Design von PCR/qPCR-Assays

Für ausgewählte Gene (u. a. KI-67), deren Expression für die Charakterisierung des Zellwachstums und/oder der Infektion ermittelt werden sollten, wurden qPCR-Assays gemäß den Standardeinstellungen der Primer3-Software designt [194]. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen kodierenden Sequenzen der betreffenden Gene in das Online-Tool geladen und eine gewünschte Amplikon-Länge von 80 bis 150 Basenpaaren vorgegeben.

Die durch die Primer3-Software ausgegebenen qPCR-Assays wurden zunächst mit dem UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/) auf ihre Einzigartigkeit auf dem humanen Genom überprüft. Weiterhin wurden die Oligonukleotide mit dem Oligo Analyzer (http://eu.idtdna.com/calc/analyzer) auf etwaige Sekundärstrukturen und Homo- sowie Heterodimerbildungen untersucht.

2.15.2. Herstellung von qPCR Standards

Zu Quantifizierungszwecken wurden für verschiedene selbstdesignte qPCR-Assays hochreine Lösungen von Plasmidstandards hergestellt. Nach Ermittlung der Konzentration der Plasmide innerhalb dieser Lösungen durch DNA-Quantifizierung (siehe 2.14.5) können die Kopienzahlen der jeweiligen Sequenz ermittelt werden und die Standardplasmide anschließend auf eine gewünschte Konzentration verdünnt werden.

a) Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als erster Schritt zur Herstellung von Standards für die qPCR wurden cDNAs aus NHEK-Zelllysaten als Vorlage für eine konventionelle PCR verwendet. Hierfür wurden die jeweilige Primer und die Platinum[®] Taq-Polymerase (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet (Tab. 14). Die Reaktionen wurden in einem Thermozykler nach einem Temperaturprofil gemäß Tab. 15 durchgeführt. Je 5 µl der Amplifikate und 1 µl 6 X DNA Probenpuffer wurden vermischt und auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 min, 90 V). Die auf der korrekten Höhe des Gels befindlichen Amplifikate wurden auf einem Transilluminator mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Reagenz	Volumen je Ansatz [µl]
bidestilliertes Wasser	15.9
PCR-Puffer 10 X	2.5
MgCl ₂ 50 mM	2
dNTPs 2,5 mM	2
Primer F 10 μM	0.75
Primer R 10 μM	0.75
Platinum Taq-Pol 5 U/µl	0.1
Template DNA/cDNA	1
<u>Summe</u>	25

Tah	15.	Thermo	nrofil	oinor	PCR-	Reaktion
I dD.	TD:	mermo		emer	PUR-	пеакцоп

Temperatur	Zeit [s]	
95° C	600	
95° C	10	45
60° C	35	45 X

b) Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus den Gelabschnitten erfolgte mit dem PCR-Purification Kit (Macherey-Nagel) gemäß Standardprotokoll. Nach Ermittlung der DNA-Konzentrationen in den Eluaten mittels spektrophotometischer Messung am NanoDrop (siehe 2.14.5) wurden die Eluate bei - 20° C gelagert.

c) Ligation und Transformation in E. coli TOP10

Die Ligation der PCR-Produkte in TOPO[®]-Vektoren sowie die anschließende Transformation der Vektoren in kompetente E. coli TOP10-Zellen und die Vervielfältigung positiver Klone erfolgte gemäß des Standardprotokolls des TOPO[®] TA Cloning[®] Kits (life technologies).

d) Plasmidpräparation

Die Präparation der Standardplasmide aus den vervielfältigten Bakterienklonen erfolgte gemäß des Standardprotokolls PureLink[®] Quick Plasmid Miniprep Kits (Invitrogen). Angeimpftes LB-Medium wurde über Nacht bei 37° C unter Schütteln inkubiert und 5 ml der Bakterienkultur wurden für die Extraktion eingesetzt.

2.15.3. qPCR mit TaqMan-Sonden

Für die spezifische Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde die quantitative real-time PCR (qPCR) mit TaqMan[®] Sonden verwendet. Der durch die qPCR erhaltene cT-Wert (*threshold cycle*) kann mittels verschiedener Methoden zur absoluten oder relativen Quantifizierung der analysierten cDNA oder DNA genutzt werden. Ein qPCR-Ansatz enthält neben den Bestandteilen einer konventionellen PCR zusätzlich eine Sonde, welche komplementär zur jeweils zu analysierenden Gensequenz ist. Der Reaktionsansatz für hausinterne qPCR-Assays ist Tab. 16 zu entnehmen. Neben hausintern designten qPCR-Assays wurden auch kommerzielle *TaqMan[®] Gene Expression Assays* (Life Technologies) verwendet, deren Reaktionsansatz sich gemäß Tab. 17 von der Standardzusammensetzung unterschied. Die qPCR Reaktionen wurden im ABI 7500 System (Applied Biosystems) durchgeführt. Das Temperaturprofil aller analysierten Gene ist Tab. 15 zu entnehmen. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte während der Elongationsphase. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der ABI 7500 Software (Applied Biosystems).

Reagenz	Volumen je Ansatz [µl]
bidestilliertes Wasser	14.15
PCR-Puffer 10 X	2.5
MgCl ₂ 50 mM	2
dNTPs 2,5 mM	2
Primer F 10 μM	0.75
Primer R 10 μM	0.75
Sonde 10 µM	0.25
Platinum Taq-Pol 5 U/µl	0.1
Template DNA/cDNA	2.5
Summe	25

Tab.	16:	Ansatz	für	hausinterne	qPCRs
------	-----	--------	-----	-------------	-------

Tab. 17: Ansatz für TaqMan Gene Expression Assays			
Reagenz	Volumen je Ansatz [µl]		
bidestilliertes Wasser	15.4		
PCR-Puffer 10 X	2.5		
MgCl ₂ 50 mM	2		
dNTPs 2,5 mM	2		
Oligo Mix	0.5		
Platinum Taq-Pol 5 U/μl	0.1		
Template DNA/cDNA	2.5		
<u>Summe</u>	25		

a) Quantifizierung mit Standards

Eine absolute Quantifizierung der erhaltenen cT-Werte ist mit Hilfe des Abgleiches mit qPCR-Standards möglich (siehe 2.15.2). Durch die qPCR-Analyse von Standards mit unterschiedlichen bekannten Konzentrationen der Zielsequenz kann eine Regressionsgerade erstellt werden, die eine direkte Korrelation der erhaltenen cT-Werte mit der jeweiligen Konzentration der Zielsequenz erlaubt. Den ermittelten cT-Werten untersuchter Proben kann somit eine konkrete Kopienzahl zugeordnet werden.

b) Quantifizierung mittels ΔΔcT-Methode

Die $\Delta\Delta$ cT-Methode erlaubt eine relative Quantifizierung der Genexpression zwischen verschiedenen Proben. Der cT-Wert des Zielgens einer Probe wird zu diesem Zweck zunächst auf ein oder mehrere Referenzgene normalisiert und dann in Relation zu einem Vergleichswert einer anderen Probe gesetzt. Als Referenzgene dienten in dieser Arbeit die zellulären Gene *MYC, GAPDH* und *TBP*. Die Normalisierung erfolgt durch Bildung der Δ cT Werte der zu vergleichenden Proben nach der Formel: Δ cT = cT_{Zielgen} – cT_{Referenzgen}. Die Standardabweichung (s) des Δ cT Werts wird nach folgender Formel aus den Standardabweichungen der mittleren cT Werte des Zielgens (s_{Ziel}) und des Referenzgens (s_{Ref}) berechnet: $s = (s_{Ziel}^2 + s_{Ref}^2)^{1/2}$. Der $\Delta\Delta$ cT-Wert wird nach folgender Formel berechnet: $\Delta\Delta$ cT = Δ cT_{Probe1} – Δ cT_{Probe2}. Bei dieser Rechnung kann der Δ cT_{Probe1} z. B. dem Wert einer infizierten Probe entsprechen und der Δ cT_{Probe2} dem Wert einer nicht-infizierten Kontrolle. Der *Fold Change* (FC), also der relative Unterschied in der Expression des Zielgens zwischen den analysierten Proben wird über folgende Formel berechnet: FC = $2^{-\Delta\Delta$ cT. Die Standardabweichung des $\Delta\Delta$ cT-Werts entspricht der Standardabweichung des Δ cT_{Probe1}-Werts. Indem man die Standardabweichung vom $\Delta\Delta$ cT-Wert subtrahiert bzw. zu diesem addiert, erhält man das obere und untere Limit des zu erwartenden FCs: FC_{unten} = $2^{-(\Delta\Delta$ cT-s)}; FC_{oben} = $2^{-(\Delta\Delta$ CT-s)}.

2.16. Proteinbiochemische Methoden

2.16.1. Aufarbeitung von RIPA-Proben

Im Monolayer kultivierte Zellen wurden nach einem Waschschritt mit PBS⁻ in 200 µl RIPA-Puffer inkl. 1 X Protease-/Phosphatase-Inhibitoren aufgenommen und für 5 min bei RT in der Zellkulturplatte inkubiert. Nach dem Ablösen mit einem Zellschaber und mehrmaligem Resuspendieren mittels Pipette wurden die Lysate in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80° C gelagert. Das Auftauen der Lysate erfolgte auf Eis.

Die 3D-Präparate wurden nach den abgeschlossenen Kultivierungs- oder Infektionsversuchen mit einer Pinzette zum Waschen durch zwei mit PBS⁻ gefüllte 50 ml Zentrifugenröhrchen gezogen und anschließend in Mikroschraubröhrchen mit 250 µl RIPA-Puffer inkl. 1 X Protease-/Phosphatase-Inhibitoren transferiert. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung der Proben bei -80° C. Im Anschluss an das Auftauen der Lysate auf Eis erfolgte die Homogenisation mit dem Homogenisator FastPrep-24 (MP Biomedicals) (6 m/s, 20 s).

Sowohl die Monolayer als auch die 3D RIPA-Lysate wurden für den Zellaufschluss bei 4° C mit Ultraschall behandelt (3 x, 20 s) und anschließend bei 14.000 x g für 10 min zentrifugiert (4° C), um die Proteine von den Zelltrümmern zu trennen. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bis zur Analyse auf Eis (Kurzzeit) oder bei -80° C gelagert.

2.16.2. Protein-Quantifizierung mittels Tryptophan-Bestimmung

Für die Proteinquantifizierung aus den RIPA-Lysaten wurde eine kürzlich etablierte Methode verwendet, die auf der Tryptophan-Bestimmung aus Proteinlysaten basiert [195]. Hierfür wurden die Proben jeweils 1:20 in bidestilliertem Wasser verdünnt und in Dreifachansätzen je 200 µl in die Wells einer lichtundurchlässigen, weißen 96 Well Platte gegeben. Zur Quantifizierung diente ein in Wasser verdünnter Tryptophan-Standard (0,05 bis 0,9 µg/200 µl), der mit 5 % RIPA-Puffer (inkl. 1 X Protease-/Phosphatase-Inhibitoren) versetzt wurde und ebenfalls in Dreifachansätzen in die 96 Well Platte transferiert wurde. Als Nullprobe (blank) wurde Wasser mit 5 % RIPA-Puffer inkl. 1 X Protease-/Phosphatase-Inhibitoren verwendet. Mit dem Plattenlesegerät Infinite M200 Pro (Tecan) wurde die spezifisch vom Tryptophan ausgehende Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 350 nm gemessen. Nach Abzug des Nullwertes von den Proben und den Standards wurde durch den Vergleich mit der ermittelten Standardgerade die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

2.16.3. denaturierende SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde im vertikalen MiniProtean III System (Bio-Rad Laboratories) in 1 X TGS-Laufpuffer (Bio-Rad Labs.) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas) verwendet. 10 µg der RIPA-Lysate wurden mit RIPA-Puffer auf 28 µl aufgefüllt und mit 7 µl 5 X Proteinladepuffer versetzt (Lane Marker Reducing Sample Buffer, Pierce). Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 5 min auf 95° C erhitzt und anschließend bis zur Gelbeladung auf Eis gehalten.

Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte in kommerziellen 10 Well Any kD Mini-Protean TGX Precast Protein Gelen (Bio-Rad Labs.) mit einem Polyacrylamid-Gradienten, der für eine Auftrennung von Peptiden zwischen 10 und 100 kDa optimiert ist. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V für 35 min.

2.16.4. Semi-dry Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus den SDS-Gelen auf PVDF Membranen mittels Western-Blot wurde nach dem Semi-Dry Verfahren im Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System (Bio-Rad Labs.) mit dem Trans-Blot Turbo[™] RTA Mini PVDF Transfer Kit (Bio-Rad Labs.) gemäß Standardprotokoll durchgeführt.

Die PVDF Membranen wurden hierfür zunächst für 20 s in Methanol aktiviert und anschließend parallel mit den Filterpapieren und dem SDS-Gel für 5 min in 1 X Transfer-Puffer äquilibriert. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte mittels *rapid blot transfer* innerhalb von 3 min.

2.16.5. Immunologische Färbung

Nach dem Transfer wurden die Membranen für 60 min in Blockierlösung inkubiert, um freie Bindestellen auf der Membran unspezifisch zu sättigen. Die immunologische Detektion mit Primärantikörpern erfolgte entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C unter Rotation in Blockierlösung. Unspezifisch gebundene und ungebundene Antikörper wurden anschließend durch Waschen der Membran (3 × 5 min in PBS-T) entfernt. Die Inkubation mit dem jeweiligen Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei RT unter Rotation in Blockierlösung. Nach dem Waschen der Membran in PBS-T (2 × 5 min) und PBS⁻ (2 × 5 min) erfolgte die Chemilumineszenzbasierte Detektion des sekundären Antikörpers mit dem SuperSignal[™] West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) nach Standardprotokoll.

Die Detektion der Chemolumineszenzsignale erfolgte mit dem ChemiDok MP System (Bio-Rad Labs.). Für die Auswertung wurde die Software ImageLab (Version 5.2.1, Bio-Rad Labs.) verwendet.

2.16.6. Strippen der Membran

Um die Verwendung einer Membran für die Färbung mehrerer Proteine ähnlichen Molekulargewichts nacheinander zu ermöglichen, wurden bereits auf den Membranen gebundene Antikörper mit dem Western Blot Stripping Puffer Restore PLUS (Thermo Scientific) entfernt.

Zu diesem Zweck wurden die Membranen nach der Chemolumineszenzdetektion jeweils dreimal 5 min in bidestilliertem Wasser und PBS-T gewaschen und anschließend für 15 min bei RT im Stripping Puffer auf einem Horizontalschüttler (100 rpm) inkubiert. Nach jeweils drei Waschschritten von 5 min mit bidestilliertem Wasser und PBS-T wurde die Membran nochmals für 60 min in PBS-T gewaschen und stand anschließend für weitere immunologische Detektionen zur Verfügung.

2.17. Histologische Methoden

2.17.1. Probenpräparation für IHC

Die 3D-Präparate wurden nach den abgeschlossenen Kultivierungs- oder Infektionsversuchen mit einer Pinzette zum Waschen durch zwei mit PBS⁻ gefüllte 50 ml Zentrifugenröhrchen gezogen und anschließend in die Wells einer 48 Well Platte mit 4 % PFA-Lösung (in PBS⁻) überführt.

Die Fixierung erfolgte für 1 h bei RT. Die anschließende Entwässerung der Proben erfolgte über einen Sucrosegradienten. Zunächst wurden die Präparate mit einer Pinzette in eine 15 %ige Sucroselösung (in PBS⁻) überführt und für 24 h bei 4° C äquilibriert. Im Anschluss erfolgte das Übertragen in eine 30 %ige Sucroselösung (in PBS⁻) und eine Inkubation für weitere 4 h bei RT. Die entwässerten Präparate wurden in Kryoprobenröhrchen (ROTH) mit 300 µl Tissue-Tek[®] (Sakura) transferiert und für 2 h bei RT äquilibriert. Nachdem die Präparate mit Hilfe einer Pinzette in eine gerade, horizontale Lage zentral im Probenröhrchen positioniert wurden, erfolgte das Einfrieren in Flüssigstickstoff und eine Lagerung bei -80° C.

2.17.2. Herstellung von Kryoschnitten

24 h vor der Anfertigung der Kryoschnitte wurden die Probenröhrchen zur Voräquilibrierung bei -20° C gelagert. Der Transport der Präparate zum Kryomikrotom Leica CM1950 erfolgte auf Trockeneis, um das An- oder Auftauen der Proben zu verhindern, was die Integrität der Matrix stark schädigen und die Position der Präparate im Tissue-Tek® verändern würde. Die zu schneidenden Präparate wurden zwecks Äquilibrierung im Innenraum des Gerätes gelagert und die Temperaturen des Kryomikrotoms etwa ein bis zwei Stunden vor Beginn der Schnitte eingestellt (Probenteller: -19° C; Probenkammer: -16° C). Anschließend wurde der Tissue-Tek®-Block mit einer Kanüle aus dem Probenröhrchen herausgeschoben und mit einem Tropfen Tissue-Tek® auf dem Probenteller fixiert. Nach 10 min wurde der Probenteller in den Objektkopf eingespannt und der Block mit der Option "TRIM" bis in die richtige Schnittebene zurechtgestutzt. Zu erkennen war diese Ebene an einer leicht gelblichen Färbung der Präparate im Vergleich zum weißen Tissue-Tek®-Hintergrund. Mit der Option "SECT" wurden Schnitte von 8 µm Dicke angefertigt und auf die Objektträger SuperFrost® Plus Gold (Menzel) transferiert. Hierfür wurden die Objektträger an beiden Enden mit Daumen und Zeigefinger gehalten und in die unmittelbare Nähe des Schnittes gebracht, wodurch er durch Adhäsionskräfte auf den Objektträger übertragen wurde. Pro Objektträger wurden 3 Schnitte aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bis zur Färbung bei -20° C (Abb. 8).



Abb. 8: Kryoschnittpräparation von 3D-Zellkulturen. Fixierte und entwässerte 3D-Präparate wurden durch Flüssigstickstoff in Tissue-Tek[®] eingefroren und bei -80° C gelagert. Nach einer Äquilibrierungszeit von 24 h bei -20° C wurden die Tissue-Tek[®]-Blöcke im Kryomikrotom Leica CM1950 auf Probentellern fixiert (A) und in den Objektkopf eingespannt (B). Das Erreichen der korrekten Schnittebene war ersichtlich durch eine leichte Gelbfärbung der Präparate (roter Pfeil, C). Es wurden jeweils drei Schnittpräparate einer Dicke von 8 μm auf die Objektträger SuperFrost[®] Plus Gold durch Auflegen der Objektträger aufgebracht (rote Kreise, D). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.17.3. Immunhistochemische Färbung (IHC) von Gewebeschnitten

Vor der IHC wurden die zu färbenden Objektträger für 30 min bei RT äquilibriert und anschließend jeder Schnitt mit einem hydrophoben Fettstift (ImmEdge Barrier Pen, Vector Laboratories) umrandet. Von jeder der folgenden Lösungen oder Verdünnungen wurden 50 µl Volumen pro Gewebeschnitt verwendet. Alle Vorbehandlungen und Färbungen erfolgten bei erhöhter Luftfeuchtigkeit in Petrischalen mit wassergetränkten Zellstofftüchern. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger auf Zellstoff ausgeklopft und zu Waschzwecken durch drei mit PBS⁻ gefüllte Bechergläser gezogen.

Optional wurden zunächst die Zellmembranbestandteile Sialinsäure und *N*-Acetylglucosamin mittels 1:400 in IFA-Puffer verdünntem Alexa Fluor[®] 594-gekoppeltem Weizenkeimagglutinin (*wheat germ agglutinin* – WGA) gefärbt (20 min, 37° C). Nach der anschließenden Permeabilisierung der Zellmembranen mit 0,1 % Triton-X 100 in PBS⁻ für 10 min bei RT, erfolgte die immunologische Detektion der zu analysierenden Antigene mittels Verdünnungen spezifischer Antikörper in IFA-Puffer (1 h, 37° C). Die Detektion der primären Antikörper erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper-Verdünnungen in IFA-Puffer (1 h, 37° C). Eine DAPI-Kernfärbung erfolgte parallel zum Eindeckeln der Präparate mit dem Fluoroshield Mounting Medium (Sigma-Aldrich) und Deckgläsern. Die Lagerung gefärbter und konservierter Objektträger erfolgte bis zur Analyse bei 4° C im Dunkeln.

2.17.4. Immunfluoreszenzassay (IFA) von 2D-Präparaten

In 8 Well Zellkulturkammern (Lab-Tek[™] II, NUNC) kultivierte und ggf. behandelte und infizierte Zellen wurden nach Beendigung der Kultivierung für 1 h bei RT in 4 % PFA-Lösung (in PBS⁻) fixiert und anschließend mit 400 µl IFA-Puffer pro Kammer und durch Parafilm geschützt bei 4° C gelagert.

Von jeder der folgenden Lösungen oder Verdünnungen wurden im IFA 150 µl Volumen pro Kammer verwendet. Alle Vorbehandlungen und Färbungen erfolgten analog zur Färbung von Gewebeschnitte (siehe 2.17.3). Nach dem Waschschritt in Folge der Sekundärantikörper-Inkubation wurde die Inkubationskammer vom Objektträger entfernt. Die DAPI-Kernfärbung, das Eindeckeln und die Lagerung der gefärbten Objektträger erfolgte analog zu 2.17.3.

2.17.5. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von IHC- und IFA-Präparaten

Die Analyse der immunologisch gefärbten Präparate (IHC + IFA) erfolgte entweder an dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss) mit der Software AxioVision LE 4.8.2 (Carl Zeiss) oder mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (cLSM) an einem LSM 780 Konfokalmikroskop (Carl Zeiss) mit der Software ZEN 2012 (Carl Zeiss).

Bei diesem Verfahren rastert ein vom Objektiv fokussierter Laserstrahl das Präparat punktweise ab, wodurch im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie für jede Koordinate im Objekt ein spezifisches Signal ohne Streulicht von benachbarten Punkten aufgenommen werden kann. Daraus resultieren mikroskopische Aufnahmen mit deutlich erhöhter Auflösung, die u. a. eine genauere Lokalisierung von Proteinen ermöglicht als bei konventioneller Fluoreszenzmikroskopie [196].

2.17.6. Erstellung von digitalen vertikalen Schnitten mittels cLSM

Für die genaue Lokalisierung von Proteinen innerhalb von Monolayer-kultivierten Zellen auf der z-Achse, also orthogonal zur Bildebene gerichtet, wurden mit der Option "z-stack" der cLSM Software ZEN 2012 (Carl Zeiss) digitale vertikale Schnitte der Kulturen erstellt. Hierfür wurde zunächst die zentrale mikroskopische Fokusebene des Präparats mit Hilfe des DAPI-Kanals eingestellt und an diesem Punkt eine Live Aufnahme gestartet. Nach einer Defokussierung des Bildes im Uhrzeigersinn wurde der Start der späteren Aufnahme mit dem Button "set first" definiert. Das Ende der Aufnahme wurde über eine Defokussierung des Bildes entgegen des Uhrzeigersinns mit dem Button "set last" festgelegt. Nach dem Beenden der Live Aufnahme wurde die Anzahl an Bildern festgelegt, die innerhalb des ausgewählten Bereiches aufgenommen werden sollten. Die typische Tiefe dieses Bereiches für Monolayer-kultivierte Epithelzellen betrug etwa 10 μm. Eine Aufnahme von 30 Einzelbildern umfasste somit eine um jeweils 330 nm versetzte fluoreszenzmikroskopische Analyse der jeweiligen Zielproteine.

Nach der Wahl der zu analysierenden Fluoreszenzkanäle wurde über den Button "Start Experiment" die Aufnahme der Bilder gestartet. Eine Analyse der überlagerten Einzelbilder in z-Richtung, also als digitaler vertikaler Schnitt durch die horizontale Bildebene, war über die Option "Ortho" möglich.

2.17.7. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Zum Zwecke der hochauflösenden Analyse der Zellmorphologie sowie der Bildung und Struktur viraler Partikel im 3D-Modell wurden Präparate angefertigt, die mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) im Fachbereich ZBS 4 des RKI untersucht wurden. Die Präparate wurden nach der Kultivierung in einer strukturschonenden Lösung aus 2,5 % Glutaraldehyd und 1 % Paraformaldehyd in 0,5 mM HEPES (Klinikfixans) für 1 h bei RT fixiert und anschließend durch Gudrun Holland (ZBS4) gemäß Standardprotokoll präpariert und visualisiert [197]. Dieses Protokoll beinhaltet die Einbettung der Präparate in Epon-Harz, die Markierung von Nukleinsäuren mit Uranylacetat und von Proteinen mit Tanninsäure, die Präparation von Ultradünnschnitten und eine abschließende Nach- bzw. Negativkontrastierung.

2.18. Transkriptomanalyse mittels NGS

Ungezielte Genexpressionsanalysen verschiedener repräsentativer nicht-infizierter und CPXVinfizierter Proben mittels NGS-basierter Transkriptomanalyse (Illumina Brückensequenzierung) erfolgten zum Zwecke der Charakterisierung des Zellwachstums und der zellulären und viralen modellabhängigen Infektionsantwort.

2.18.1. Probenvorbereitung

Der RNA-Gehalt isolierter und bei -80°C gelagerter RNA (siehe 2.14.2) wurde vor der NGS-Probenpräparation mit dem Qubit 2.0 (siehe 2.14.5) bestimmt. Die Bestimmung der RNA-Integrität erfolgte anschließend mit dem Bioanalyzer (siehe 2.14.6).

2.18.2. NGS mittels HiSeq Plattform

Die cDNA-Bibliotheken (Libraries) wurden mit dem TrueSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina) präpariert und mit dem KAPA Library Quantification Kit quantifiziert. Die Fragmentgrößen der resultierenden Bibliotheken wurden mit dem High Sensitivity DNA Analysis Kit am Bioanalyzer bestimmt. Die cDNAs wurden anschließend mit PCR-Wasser auf eine Konzentration von 12 pM verdünnt und mit dem Illumina HiSeq 1500 im *rapid mode* sequenziert.

Die Generierung der Cluster auf dem Chip des Gerätes erfolgte mit dem TruSeq Rapid PE Cluster Kit - HS und die Sequenzierung mit dem HiSeq Rapid SBS Kit - HS im paired-end Verfahren mit 101 + 101 Basen. Zur Qualitätskontrolle diente 1 % der PhiX Control v3. Sämtliche Schritte erfolgten gemäß den jeweiligen Standardprotokollen.

Die generierten Datensätze wurden hausintern vom RKI-Bioinformatikservice durch Wojtek Dabrowski vorprozessiert. Auf Basis probenspezifischer Adaptoren wurden die Daten (Reads) den verschiedenen Proben zugeordnet. Die Adaptoren wurden von den Reads abgeschnitten und die Reads in separaten FASTA-Dateien gespeichert.

2.18.3. Daten Prozessierung mit Partek Flow

Die Qualitätskontrollen und die Auswertung der generierten vorprozessierten Daten erfolgte anhand eines selbstdesignten Workflows (Abb. 9) mit dem Programm Partek Flow (Roche). Nach Ermittlung der Quantität und Qualität der Reads wurde die Anzahl der zu trimmenden Basen ermittelt. Von allen Reads wurden 8 Basen vom 5'-Ende und 1 Base vom 3'-Ende entfernt, um eine einheitliche Qualität aller Daten zu erzielen. Die prozessierten Reads wurden zunächst mit Bowtie2 gegen das Referenzgenom des Kuhpockenstammes CPXV BR (AF482758) aligniert und anschließend für Vergleiche des viralen Transkriptoms verschiedener Proben auf eine Million Reads normiert.

Die Analyse der differentiellen Genexpression erfolgte mittels eines Partek Algorithmus zur genspezifischen Analyse, der zunächst die statistische Verteilung der Reads testet und auf Grundlage dessen ein passendes Modell für die individuellen Gene annimmt. Im Anschluss wurde die Expressionsänderung und deren modellabhängige statistische Signifikanz der einzelnen Gene zwischen den gewählten Gruppen berechnet.

Im weiteren Verlauf des Workflows wurden die bis dahin nicht zugeordneten Reads mittels Bowtie2 gegen das humane Genom mit der Referenz GRCh37 (hg19) Version 67, RefSeq aligniert. Entsprechend des Vorgehens mit den viralen Reads wurden die hier zugeordneten Reads quantifiziert und normalisiert. Die Berechnung der Expressionsänderung zwischen verschiedenen analysierten Gruppen erfolgte jeweils auf Transkriptebene (mit Isoformen) und Genebene (ohne Isoformen), wobei im weiteren Verlauf nur die Analysen auf Genebene dargestellt sind, da eine Betrachtung verschiedener Isoformen nicht Bestandteil der verfassten Arbeit waren.



Abb. 9: Etablierter Workflow für vergleichende Transkriptomanalysen in Partek Flow. Die durch einen HiSeq-Lauf generierten Reads der sequenzierten cDNA-Bibliotheken wurden durch den RKI-Bioinformatikservice vorprozessiert und in FASTA-Dateien in Partek Flow importiert. Nach dem qualitätsbedingten Trimmen weniger Basen vom 5'- und 3'-Ende der Reads, wurden diese zunächst auf das CPXV-Genom aligniert (optional) und anschließend für eine Expressionsanalyse den spezifischen viralen Genen zugeordnet. Für alle nicht alignierten Reads wurde dieser Prozess mit dem humanen Genom wiederholt, um differentielle Wirtsgenexpressionen analysieren zu können. Dies wurde sowohl auf Transkriptebene mit verschiedenen Isoformen (grün) als auch auf Genebene ohne Unterscheidung von Isoformen (blau) durchgeführt. Der gesamte Prozess wurde begleitet durch regelmäßige Qualitätsbestimmungen und -kontrollen (QA/QC).

Um relevante Kandidaten für eine regulierte Genexpression aus den resultierenden Genlisten zu extrahieren, wurden diese Listen nach drei Faktoren gefiltert. Die normalisierte Expression zwischen den verglichenen Gruppen musste sich bei einer False Discovery Rate (FDR) von unter 0,05 und einer Readzahl von mindestens 100 um mehr als den Faktor 2 nach oben oder unten unterscheiden.

Die Expressionslevel einzelner Kandidatengene wurden zu Verifizierungszwecken auf mRNA-Ebene mittels qPCR (siehe 2.15.3) und/oder auf Proteinebene mittels IHC/IFA (siehe 2.17) oder Western Blot (siehe 2.16) analysiert.

2.18.4. GO-Term Analysen mit Cytoscape (BiNGO-Tool)

Um Aussagen über die biologische Relevanz von differentieller Expression zwischen verschiedenen Vergleichsgruppen zu erhalten, wurden signifikant regulierte Gene aus vergleichenden Transkriptomanalysen von 3D- und Monolayer-NHEK-Kulturen mittels BiNGO-Tool (Cytoscape) in sogenannte GO-Terms (GO: *gene ontology*) eingruppiert [198]. Hierfür wurden aus Partek Flow extrahierte Listen von Genen mit mehr als 100 Reads, deren FC mit einer Signifikanz von FDR < 0,05 entweder größer als 2 oder kleiner als -2 war, in das BiNGO-Tool hinein geladen und mittels hypergeometrischer Signifikanztestung biologischen Prozessen zugeordnet (GO_Biological_Process). Der p-Wert und somit die Signifikanz eines so ermittelten regulierten biologischen Prozesses für den jeweils betrachteten Vergleich ist in diesem Zusammenhang abhängig von der Anzahl der Gene, die einem solchen Cluster zugeordnet wurden und von der Überrepräsentation der zugeordneten Gene innerhalb der analysierten Genliste gegenüber der theoretisch auftretenden Wahrscheinlichkeit einer Zuordnung zum entsprechenden GO-Term.

2.18.5. Analyse hierarchischer Cluster mit CIMminer

Um Gemeinsamkeiten der Genexpressionsänderung in unterschiedlichen Zellkulturmodellen in Folge einer CPXV-Infektion zu analysieren, wurden aus den Transkriptomanalysen die in den einzelnen Kultivierungsmodellen durch die Infektion jeweils 30 am stärksten signifikant hoch- bzw. herunterregulierten Gene inklusive der dazugehörigen *Fold Changes* (FC) extrahiert und den korrespondierenden FCs aus den jeweils anderen Infektionsmodellen gegenübergestellt (Excel 2010). Duplikate wurden entfernt, die FCs zur Basis 2 logarithmiert und die resultierende Matrix bestehend aus den Gennamen und den dazugehörigen FCs der verschiedenen Kultivierungsmodelle als Tabstopp-getrennte *.txt-Datei gespeichert. Die Datei wurde in die Online-Software CIMminer (https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do) importiert und mittels R-basierter Algorithmen auf gemeinsame Gencluster analysiert. Unter den erweiterten Optionen wurde als Gruppierungsalgorithmus für die Ermittlung des Farbcodes die Einteilung in Quantile ausgewählt.

2.19. Zellbasierter Viabilitätsassay: CellTiter-Glo[®] (Promega)

Zur Ermittlung der Zellviabilität wurde der Endpunkt-Assay CellTiter-Glo® (Promega) verwendet. Zum gewünschten Zeitpunkt der Viabilitätsermittlung wurden die Zellen mittels einer Multikomponenten-Lösung zunächst innerhalb der Kultivierungsplatten lysiert. Mit dem freigesetzten ATP als Marker für viable Zellen wurde anschließend zusammen mit freien Magnesium-Ionen durch Luciferasekatalysierte Mono-Oxygenierung von Luciferin zu Oxyluciferin ein Lichtsignal generiert, welches proportional zum verbrauchten ATP war. Für Monolayer-kultivierte Vero E6-Zellen erfolgte das Vorgehen nach Standardprotokoll. NHEK-Monolayer waren gegenüber den lytischen Komponenten des Assays deutlich resistenter und mussten daher länger unter horizontalem Schütteln inkubiert werden als nach Protokoll vorgegeben (30 min statt 2 min). 3D-Kulturen wurden nach der Kultivierung mit sterilen Pinzetten in neue 48 Well Platten überführt, in denen pro Well 250 µl des jeweiligen Wachstumsmediums vorgelegt waren. Nach der Zugabe von 250 µl des Reagenz erfolgte zur effektiven Einleitung der Zelllyse eine 10-minütige Inkubation auf einem Horizontalschüttler bei RT (400 rpm).

Nach einer Signalstabilisierungsphase von 20 min bei RT wurden die Proben jeweils 1:2 in Wachstumsmedium verdünnt und pro Probe 200 μ l in Duplikaten in undurchsichtige weiße 96 Well Platten gegeben. Die Messung des Lumineszenzsignals erfolgte an dem Plattenlesegerät Infinite M200 Pro (Tecan) mit der iControl Software (Tecan).

2.20. Hemmstoffversuche mit Gefitinib

Primäre humane Keratinozyten (NHEK) wurden im 3D-Zellkulturmodell in ULAP für sieben Tage (siehe 2.12.7) und in Monolayer-Kultur in 24 Well Zellkulturplatten bzw. in 8 Well Zellkulturkammern für drei Tage (siehe 2.12.1) unter regelmäßigem Mediumwechsel vorkultiviert. In DMSO gelöstes, sterilfiltriertes Gefitinib wurde in KGM2 auf Konzentrationen von 50, 10, 5, 2 und 1 µM verdünnt. Für jede Gefitinibkonzentration und die entsprechenden Kontrollen wurden mehrere parallele Kulturen angesetzt. Nach Abnahme des Kultivierungsmediums der NHEK wurde jeweils ein halbes Kultivierungsvolumen der verschiedenen Gefitinib-Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Zu den nicht-behandelten Kontrollpräparaten wurde ein halbes Kultivierungsvolumen KGM2 mit einer DMSO-Konzentration entsprechend der höchsten Gefitinib-Konzentration gegeben. Die Infektion mit CPXV mit einer MOI von 0,01 erfolgte ebenfalls in einem halben Kultivierungsvolumen KGM2 direkt nach der Zugabe von Gefitinib. Zu nicht-infizierten Kontrollpräparaten wurde ein halbes Kultivierungsvolumen KGM2 direkt nach der Zugabe von Gefitinib. Zu nicht-infizierten Kontrollpräparaten wurde ein halbes Kultivierungsvolumen KGM2 direkt nach der Zugabe von Gefitinib. Zu nicht-infizierten Kontrollpräparaten wurde ein halbes Kultivierungsvolumen KGM2 direkt nach der Zugabe von Gefitinib. Zu nicht-infizierten Kontrollpräparaten wurde ein halbes Kultivierungsvolumen KGM2 ohne CPXV gegeben.

Nach 4 h wurde das komplette Medium von den Zellen abgenommen und durch frisches KGM2 mit der jeweiligen Gefitinib- bzw. DMSO-Konzentration ersetzt. Nach Beendigung des Versuchs 48 h *p.i.* wurden Zellen beider Kultivierungsmodelle mit PBS⁻ gewaschen und entweder in biologischen Triplikaten für die Nukleinsäure-Analytik (siehe 2.14.2) oder in Einfachwerten für histologische Untersuchungen (siehe 2.17) präpariert. Viabilitätsmessungen unterschiedlich behandelter Präparate erfolgte in biologischen Duplikaten direkt nach Beendigung der Kultivierung (siehe 2.19). Die Ermittlung der halbmaximalen inhibitorischen Hemmstoff-Konzentration (IC₅₀) von Gefitinib in der Monolayer-Kultur erfolgte durch die mikroskopische Ausmessung von Virusplaques (n = 10) bei jeder Gefitinib-Konzentration und die anschließende Ermittlung einer daraus resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve durch die Software Graph Pad Prism (Version 5.04, GraphPad Software).

3.1. Charakterisierung der extrazellulären Perikard-Matrix

Um den Einfluss des Dezellularisierungsprozesses auf den strukturellen Erhalt der extrazellulären Matrix (EZM) und auf den Gehalt an Zellen und Nukleinsäuren innerhalb der Perikard-EZM zu ermitteln, wurden sowohl native als auch dezellularisierte Präparate auf verschiedenen Ebenen untersucht und miteinander verglichen. Während mikroskopische Durchlicht-Aufnahmen einen guten Strukturerhalt der dezellularisierten Matrix zeigten, war bei rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eine Zerfaserung der Kollagenstruktur nach Dezellularisierung zu erkennen (Abb. 10 A+C). Mittels DAPI-Färbung konnten im nativen Gewebe klar differenzierbare Zellkerne mit kondensierter DNA nachgewiesen werden. Auch im dezellularisierten Präparat waren Nukleinsäuren nachweisbar, allerdings eher als diffuse und stärker über die Gesamtfläche verteilte Signale (Abb. 10 B). Eine dezellularisierungsabhängige Abreicherung von zellulärer *MYC* DNA war nicht zu detektieren und *MYC* mRNA in beiden Präparaten nicht vorhanden. Mitochondriale 16S rDNA und rRNA wurde durch die Dezellularisierung jeweils um etwa zwei log-Stufen reduziert (Abb. 10 D).



Abb. 10: Vergleich von dezellularisiertem und nativem equinen Perikardgewebe. 8 µm Kryoschnitte von PFA-fixierten Proben wurden mikroskopisch mittels Durchlicht auf ihren strukturellen Erhalt (A) und mittels DAPI-Färbung auf ihren DNAbzw. Zellgehalt (B) geprüft. Tiefere Analysen der EZM-Struktur wurden rasterelektronenmikroskopisch durchgeführt (C). Für die Ermittlung des Abreicherungsgrades von Nukleinsäuren durch den Dezellularisierungsprozess wurden mittels qPCR in beiden Geweben zelluläre (*MYC*) und mitochondriale (16S) DNA und RNA pro 0,5 cm² Äquivalent ermittelt. Maßstabsbalken: 100 µm (A + B), 20 µm (C).

Zur Detektion von Basallaminakomponenten auf der EZM als potentielle Interaktionspartner für darauf aufzubringende Zellen wurden Kryoschnitte immunhistologisch auf die Proteine Kollagen IV, Fibronectin und Laminin untersucht (Abb. 11). Alle drei Proteine waren als durchgängige Schicht auf der Oberfläche der EZM zu detektieren. Während Laminin ausschließlich in dieser Schicht lokalisiert war, waren Kollagen IV innerhalb großflächiger Akkumulate und Fibronectin homogen verteilt zusätzlich innerhalb der EZM zu detektieren.



Abb. 11: Lokalisierung von Basallamina-Komponenten auf dezellularisiertem Perikard. Zur Ermittlung des Vorhandenseins und der Lokalisierung der Basallamina-Hauptkomponenten wurden 8 μm Kryoschnitte PFA-fixierter Perikard-EZM mit polyklonalen Antikörpern gegen Kollagen IV (A), Fibronectin (B) und Laminin (C) inkubiert und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mittels cLSM. Maßstabsbalken: 100 μm.

Um die Bindungsneigung des dezellularisierten Perikards für verschiedene zelluläre Komponenten zu testen, die im späteren Verlauf der Arbeit für Analysen herangezogen werden sollten, wurden Perikard-Stücke von 0,5 cm² Größe in Vero E6 Monolayer-Kulturen gegeben und anschließend zusammen mit den Zellen aufgearbeitet. Im Vergleich zu Monolayer-Kulturen, die ohne EZM inkubiert und aufgearbeitet wurden, waren weder signifikante Änderungen für die Detektion von zellulärer *MYC* DNA und mRNA noch bei der ATP-basierten Viabilitätsmessung zu beobachten (Abb. 12). Ein verfälschender Einfluss der EZM auf die nachfolgenden Analysen auf Nukleinsäure- und Viabilitätsebene konnte somit ausgeschlossen werden.



Abb. 12: Bindungsneigung des Perikards für Nukleinsäuren und ATP. Zur Bestimmung der Bindungsneigung dezellularisierten Perikards für zelluläre Komponenten wurden die Auswirkungen co-inkubierter Perikard-Stücke von 0,5 cm² Größe in Vero E6 Monolayer-Kulturen auf den Nachweis zellulärer DNA und RNA sowie für den verwendeten Viabilitätsmarker ATP überprüft. - Perikard: Monolayer ohne Perikard. + Perikard: Monolayer mit Perikard co-inkubiert. RLU = *relative luminescence units.*

3.2. Repopulation der dezellularisierten EZM

3.2.1. Statische Betrachtung

Um für den Aufbau eines leicht zu handhabenden 3D-Zellkultursystems als Infektionsmodell ein möglichst großes Zellspektrum für spätere Virusinfektionsstudien zu gewährleisten, wurde die dezellularisierte EZM mit fünf verschiedenen Zelltypen rezellularisiert und die Zellkulturen anschließend charakterisiert.



Abb. 13: Repopulation des dezellularisierten Perikards mit verschiedenen Zelltypen. Dezellularisiertes Perikard wurde jeweils mit 1 x 10^5 Zellen versetzt und für 7 Tage kultiviert. Zur Charakterisierung des Wachstums der epithelialen Zelllinien Vero E6 (A) und HaCat (B) sowie der primären humanen Keratinozyten (NHEK)(C), Endothelzellen (HUVEC) (D) und Fibroblasten (NHDF) (E) auf morphologischer Ebene wurde eine DAPI-Kernfärbung (blau) von 8 µm Kryoschnitten durchgeführt. Als weitere Charakteristika wurden für jeden getesteten Zelltypen die durchschnittlichen Zellzahlen über MYC-DNA-Quantifizierung und Viabilitätswerte mittels ATP-Messung pro Präparat ermittelt (n = 6) (F). RLU = *relative luminescence units*. Maßstabsbalken: 100 µm.

Neben den epithelialen Zelllinien Vero E6 und HaCat handelte es sich dabei um primäre humane Keratinozyten (NHEK) und Fibroblasten (NHDF) aus der Haut und primäre humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC). Beide Zelllinien wuchsen in einer sehr kompakten, perlenschnurartigen Weise und bildeten ein überwiegend einschichtiges Epithel auf der Oberfläche der EZM (Abb. 13 A + B). Während die NHDF hinsichtlich der Kompaktheit eine ähnliche Ausprägung wie die Zelllinien zeigten (Abb. 13 E), wuchsen NHEK und HUVEC deutlich weniger dicht aneinander gereiht auf der EZM (Abb. 13 C + D). Dies spiegelte sich auch in der Zahl der Zellen wieder, die pro 0,5 cm² Präparat auf der Matrix detektiert werden konnten. Nach einer Inkubationszeit von jeweils sieben Tagen nach Zellaussaat konnten für Vero E6- und HaCat-Zellen etwa jeweils 1 x 10⁶ Zellen und für NHDF 2 x 10⁶ Zellen ermittelt werden. NHEK mit durchschnittlich 2 x 10⁵ und HUVEC mit 3 x 10⁵ Zellen wurden pro Präparat in deutlich geringerer Zahl detektiert (Abb. 13 F). Der Quotient aus Viabilität in Form der intrazellulären ATP-Konzentration und der ermittelten Zellzahl war für alle Zelltypen außer NHEK etwa bei 2, für NHEK war er jedoch durchschnittlich 5-fach höher (Abb. 13 F).



Abb. 14: Seitenabhängigkeit des Wachstums von 3D-kultivierten NHEK und Vero E6-Zellen. Vero E6-Zellen und NHEK wurden nach Zellaussaat für jeweils 7 Tage entweder auf der strukturierten, "rauen" Seite (A) oder auf der die Basallaminatragenden "glatten" Seite (B) des Perikards kultiviert und anschließend fixiert und präpariert. Um den Einfluss der unterschiedlichen Kultivierung zu ermitteln, wurden Kryoschnitte der Präparate zur Zellkernvisualisierung mit DAPI (blau) gefärbt und auf die Basallamina-Hauptkomponente Kollagen IV (gelb) analysiert. Zudem wurden von den Präparaten jeweils in Doppelwerten die Zellzahl und Zellviabilität (C) bestimmt. RLU = *relative luminescence units*. Maßstabsbalken: 100 μm.

Da das dezellularisierte Perikard zwei strukturell unterschiedliche, jedoch makroskopisch schwer zu unterscheidende Seiten besitzt, die für eine Besiedlung mit Zellen in Frage kommen, sollte festgestellt werden, ob für verschiedene Zelltypen eine unterschiedliche Besiedlungseffizienz bzw. Reproduzierbarkeit der Kulturetablierung in Abhängigkeit von der Seite zu beobachten ist.



Abb. 15: Expression epithelialer Polarisationsmarker in 3D- und Monolayer-Kultur. Primäre humane Keratinozyten (NHEK) und Vero E6-Zellen wurden in Perikard- (3D) und Monolayer- (2D) Kultur bis zur vollen Konfluenz kultiviert und nach Fixierung und Präparation auf Zellmembrankomponenten (WGA – rot) (A) sowie die Polarisationsmarker Integrin Beta 1 (ITGB1 – gelb) (B) und die atypische Proteinkinase C (aPKC – gelb) (C) mikroskopisch analysiert. Zur Untersuchung auf eine polarisierte Expression in 2D-Kultur wurden 30 aufeinanderfolgende Aufnahmen in z-Ebene übereinander gestapelt und digital vertikal entlang der grünen und roten Linien geschnitten (A.2 – C.2 + A.4 – C.4) (grüne und rote Box). Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Zu diesem Zweck wurden gestanzte Matrizes gezielt auf der "rauen", stark strukturierten oder der "glatten", die Basallamina beherbergenden Seite mit Vero E6-Zellen oder NHEK besiedelt und nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen nach Start der Kultivierung für IHC-, qPCR- und Viabilitäts-Analysen präpariert. Vero E6-Zellen wuchsen auf der "rauen" im Vergleich zur "glatten" Seite weniger geordnet und teilweise mehrschichtig übereinander (Abb. 14 A.1 + B.1). Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Werte und die Reproduzierbarkeit der ermittelten Zellzahlen und Viabilitäten (Abb. 14 C.1). Für NHEK konnten morphologisch keine seitenabhängigen Unterschiede erzielt werden (Abb. 14 A.2 + B.2). Während die Zellzahlen sich auf beiden Seiten nicht signifikant voneinander unterschieden, war die Varianz der ermittelten Viabilitätswerte bei Zellen, die auf der "rauen" Seite wuchsen, im Vergleich zur "glatten" Seite deutlich erhöht (Abb. 14 C.2).

Ein weiteres Charakterisierungsmerkmal des Zellwachstums in der 3D-Zellkultur beruht auf der Interaktion der Zellen mit der Matrix, durch die im Gegensatz zur Monolayer-Kultivierung eine gerichtete Expression von Oberflächenproteinen resultieren kann. Zu diesem Zweck wurde die Expression der *in vivo* Epithelzell-Polarisationsmarker aPKC (atypische Proteinkinase C) und ITGB1 (Integrin Beta 1) bei Vero E6-Zellen und NHEK in 3D- und Monolayer-Kultur analysiert. Für beide Zelltypen konnte im 3D-Modell eine basale, zur EZM gerichtete Expression von ITGB1 (Abb. 15 B.1 + B.3) und eine apikale, zum Medium gerichtete Expression von aPKC (Abb. 15 C.1 + C.3) mittels Immunfluoreszenz ermittelt werden.



Abb. 16: Expression von Differenzierungsmarkern in 3D-kultivierten NHEK unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen und in humaner Haut. Um den Einfluss des Calciumgehalts auf die Zelldifferenzierung in dreidimensionaler Perikard-Kultur zu erörtern, wurden NHEK nach Zellaussaat für jeweils 10 Tage unter regelmäßigem Mediumwechsel in Keratinozytenwachstumsmedium mit geringem oder hohem Calciumgehalt kultiviert. Nach Fixierung und Präparation wurden Kryoschnitte beider Präparate und von Hautexplantaten als Referenzmaterial auf die Differenzierungsmarker Cytokeratin 14 (CK14 - grün) (A), Cytokeratin 10 (CK10 - gelb) (B) und Involucrin (gelb) (C) analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Maßstabsbalken: 50 µm.

Eine polarisierte Expression beider Proteine im Monolayer konnte für keinen der Zelltypen gezeigt werden (Abb. 15 B.2 + B.4 + C.2 + C.4). Als Kontrolle für nicht-polarisierte Expression von Proteinen wurden die Zellmembrankomponenten N-Acetyglucosamin und Sialinsäure mittels WGA (*wheat germ agglutinin*) angefärbt. Diese waren in beiden Modellen und für beide Zelltypen homogen über die gesamte Zellmembran verteilt (Abb. 15 A.1 – A.4).

Neben der Polarisation ist vor allem bei Keratinozyten die Zelldifferenzierung ein wichtiges Charakteristikum für physiologisches Wachstum. Zur Analyse von Differenzierungsprozessen wurden 3D-kultivierte NHEK zum einen in Standardkultivierungsmedium KGM2 und zum anderen in KGM2 mit stark erhöhtem Calciumgehalt (0,06 mM vs. 1,92 mM) für 7 Tage kultiviert und anschließend für IHC-Analysen präpariert. Calcium induziert bei Keratinozyten die terminale Differenzierung und führt unter anderem bei in vitro generierten Hautkulturen zur Ausbildung von in vivo-ähnlichen Schichten von Keratinozyten in der Epidermis. NHEK, die in Standardkultivierungsmedium kultiviert wurden, exprimierten neben dem Cytokeratin 14 (CK14), welches ein Marker für basal in der Epidermis liegende, stark proliferierende Keratinozyten ist, keine Proteine, die für stärker differenzierte Epidermisschichten charakteristisch sind (Abb. 16 A.1 – C.1). NHEK, die bei höherem Calciumgehalt kultiviert wurden (Abb. 16 A.2 - C.2), zeigten neben dem zum Teil mehrschichtigen Wachstum eine im Vergleich zur humanen Haut (Abb. 16 A.3 – C.3) in vivo-ähnliche Expression der drei untersuchten Differenzierungsmarker. Im basalen Bereich war ausschließlich CK14 zu detektieren (Abb. 16 A.2). In den apikalen Regionen der 3D-kultivierten Zellen waren dagegen Cytokeratin 10 (CK10) und Involucrin als Marker von stärker differenzierten Schichten der Epidermis lokalisiert. (Abb. 16 B.2 + C.2). Anders als bei humaner Haut konnte im Perikard-Modell jedoch keine unterschiedliche Lokalisation dieser beiden Proteine ausgemacht werden.



Abb. 17: Zellmorphologie von Vero E6-Zellen in 3D- und Monolayer-Kultur. Konfluente 3D- Kulturen (A) von Vero E6-Zellen wurden nach PFA- und Kryo-Fixierung mittels Kryotom horizontal geschnitten, um eine vergleichbare Betrachtungsebene zur Monolayer-Kultur (B) zu erhalten. Von beiden Kulturen wurde eine DAPI-Kernfärbung (blau) und eine Membranfärbung mit WGA (rot) durchgeführt, um die Zellmorphologie und -ausbreitung bestimmen zu können. Maßstabsbalken: 20 μm.

Für den Vergleich der Morphologie von Zellen, die sich in 3D- und Monolayer-Kultur einstellt, wurden horizontale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero E6-Zellen in beiden Modellen angefertigt und jeweils Nukleinsäuren (DAPI) und Zellmembrankomponenten (WGA) angefärbt. In 3D-Kultur (Abb. 17 A) wuchsen die Zellen deutlich kondensierter als in der Monolayer-Kultur (Abb. 17 B). Die Zellkerne waren wesentlich kleiner und in ihrer Form kubischer und zytoplasmatische Bereiche waren weniger ausgebreitet, woraus sich ableiten lässt, dass pro Fläche mehr Zellen auf der EZM wachsen konnten.

3.2.2. Dynamische Betrachtung

Um Aussagen über die Langzeitstabilität der 3D-Kulturen zu erhalten, wurde Vero E6-Zellen und NHEK jeweils über 14 Tage in Kultur gehalten und regelmäßig auf Zellzahl und Viabilität analysiert. Die Zellzahlen waren für beide Zelltypen nach Erreichen der maximalen Zelldichte zwischen Tag 4 und Tag 7 der Kultivierung bis zum letzten Tag der Analyse auf stabilem Niveau. Vero E6-Zellen erreichten mit durchschnittlich 1 x 10⁶ Zellen pro Präparat eine etwa 5- bis 10-fach höhere Zelldichte als NHEK (Abb. 18 A). Während bei Vero E6-Zellen die Viabilität zu einem ähnlichen Zeitpunkt ihren Maximalwert erreichte wie die Zellzahl und auf diesem Level über die gesamte Kultivierungsdauer verblieb, stieg die Viabilität bei 3D-kultivierten NHEK bis Tag 14 sukzessiv an und übertraf zu diesem Zeitpunkt sogar die Viabilität der Vero E6-Zellen trotz deutlich geringerer Zellzahl (Abb. 18 B).



Abb. 18: Langzeitkultivierung von NHEK und Vero E6-Zellen in Perikard-Kultur. Vero E6-Zellen und NHEK wurden unter regelmäßigem Mediumwechsel über 14 Tage in dreidimensionaler Perikard-Kultur gehalten. Um die Langzeitstabilität der 3D-Kulturen zu testen, wurden an sieben Tagen jeweils zwei 0,5 cm² Präparate pro Zelltyp aufgearbeitet und die Zellzahl (A) und die Zellviabilität (B) ermittelt. RLU = *relative luminescence units*.

Zum Zweck der Analyse eines zeitabhängigen differenziellen Verhaltens von 3D- und Monolayerkultivierten Zellen bezüglich Proliferation und Apoptose, wurden Proteinlysate von Vero E6-Zellen aus beiden Zellkulturmodellen zu verschiedenen Zeitpunkten einer Langzeitkultivierung per Western Blot analysiert. Parallel angesetzte Monolayer-Kulturen, die bis zu 24 Tage unter regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert wurden, wiesen eine bis Tag 7 steigende Proteinexpression des frühen Apoptosemarkers PUMA auf und zeigten eine bis auf eine Ausnahme (Tag 7) stetig steigende Proteinexpression des späten Apoptosemarkers cleaved PARP (cl. PARP). Die Expression des Proliferationsmarkers PCNA war über den gesamten Zeitraum der Langzeitkultivierung auf einem gleichbleibend hohem Niveau (Abb. 19 A). 3D-kultivierte Vero E6-Zellen wiesen dagegen über die ersten 10 Tage der Kultivierung unter regelmäßigem Mediumwechsel eine stetig sinkende Expression der Apoptose-assoziierten Proteine PUMA und cleaved PARP auf. Die Expression von PCNA als Maß für die Zellproliferation war über die ersten 11 Tage auf gleichbleibendem Niveau und sank anschließend bis Tag 28 der Kultivierung sukzessiv auf ein deutlich geringeres Level (Abb. 19 B). Das Level der PCNA Expression war zudem über den gesamten Kultivierungszeitraum in 3D-Kultur deutlich niedriger als in korrespondierenden Monolayer-Kulturen.



Abb. 19: Langzeitkultivierung von Vero E6-Zellen in 3D- und Monolayer-Kultur. Vero E6-Zellen wurden nach Erreichen der vollen Konfluenz an Tag 3 in 2D- (A) und an Tag 7 in 3D-Kultur (B) für jeweils 21 weitere Tage unter regelmäßigem Mediumwechsel in Kultur gehalten. Um den Verlauf der Apoptose in den beiden Kulturen zu ermitteln, wurden jeweils Proteinzelllysate von neun Zeitpunkten mittels Western Blot auf den frühen Apoptosemarker PUMA und den späten Apoptosemarker cleaved PARP analysiert. Zur Ermittlung der Zellproliferation wurden die Proben zusätzlich auf PCNA untersucht. Abbildungen aus der Diplomarbeit von Georg Hille, von mir betreut [199].

3.3. Charakterisierung der Infektion mit Kuhpockenviren

Zur Identifikation etwaiger Unterschiede im Infektionsverhalten in Abhängigkeit des Zellursprungs, wurden sämtliche Charakterisierungsversuche für Infektionen sowohl mit einer Epithelzelllinie als auch mit Epithelzellen primären Ursprungs durchgeführt. Die häufig in der Untersuchung von Pockenviren und anderen viralen Erregern eingesetzten Vero E6 wurden exemplarisch für Zelllinien und NHEK - als typische Zielzellen einer epidermalen Infektion - exemplarisch für Primärzellen verwendet. Vor Beginn eines jeden Infektionsversuches mit einem grün-fluoreszierenden Kuhpockenstamm (fCPXV), wurden die jeweiligen Zellen für 7 Tage im 3D-Zellkulturmodell bzw. für drei Tage in Monolayer-Kulturen vorinkubiert, um jeweils konfluente Kulturen zu erhalten und somit miteinander vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

3.3.1. Infektion von Zelllinien (Vero E6)

Um vorrangig die Virusweitergabe von Zelle zu Nachbarzelle, also Sekundärinfektionen, zu untersuchen, wurden Vero E6-Zellen mit einer niedrigen MOI (*multiplicity of infection*) von 0,01 infiziert, um nur etwa 1 % aller Zellen initial zu infizieren.



Abb. 20: IHC/IFA-Aufnahmen der CPXV-Ausbreitung in 3D- und Monolayer-kultivierten Vero E6-Zellen über 4 Tage bei niedriger initialer Viruslast. CPXV-infizierte (MOI = 0,01) 3D- und 2D-kultivierte Vero E6-Zellen wurden 48 h (A), 72 h (B) und 96 h (C) nach Infektion fixiert und für fluoreszenzmikroskopische Analysen präpariert. Um das Fortschreiten der Infektion sowie den sich ausbildenden zytopathischen Effekt über die Zeit zu dokumentieren, wurde das vom rekombinanten CPXV exprimierte GFP-Signal (grün) (2 + 4) analysiert und eine DAPI-Kernfärbung für die 3D-Kulturen (blau) (1) bzw. eine Durchlichtanalyse für die 2D-Kulturen (3) durchgeführt. Maßstabsbalken: 100 μm.

In 3D-Kultur konnte 48 h nach Infektion (post infectionem, p.i.) anhand des unter Viruskontrolle exprimierten GFPs eine Infektion in etwa 50 % aller Zellen nachgewiesen werden (Abb. 20 A.2). Zum gleichen Zeitpunkt war die Infektion in Monolayer-Kultur (2D) bereits weiter fortgeschritten, sodass nur noch wenige GFP-negative Zellen zu identifizieren waren (Abb. 20 A.4). Ab 72 h p.i. waren in beiden Kultivierungsmodellen ausschließlich infizierte Zellen zu detektieren (Abb. 20 B.2 + B.4), wobei nach 96 h die Intensität des GFP-Signals jeweils nochmals verstärkt wurde (Abb. 20 C.2 + C.4). Während in Monolayer-Kultur schon nach 48 h p.i. ein zytopathischer Effekt zu identifizieren war, der sich sukzessiv bis 96 h p.i. bis hin zum vollständigen Abkugeln der Zellen verstärkte (Abb. 20 A.3 - C.3), 3D-Kultur über konnten in der den gesamten Zeitraum keine infektionsabhängigen morphologischen Veränderungen detektiert werden (Abb. 20 A.1 - C.1).

Für eine Charakterisierung einer Infektion von Vero E6 mit CPXV, bei der statistisch etwa 99 % der Zellen initial mit Virus infiziert werden (MOI = 5), wurden die Präparate entsprechend früher auf morphologischer Ebene analysiert. In beiden Zellkulturmodellen konnte erst nach 8 h ein Fluoreszenzsignal des in der Virusproteinkaskade spät exprimierten GFPs detektiert werden.



Abb. 21: IHC/IFA-Aufnahmen der CPXV-Ausbreitung in 3D- und Monolayer-kultivierten Vero E6-Zellen über 18 Stunden bei hoher initialer Viruslast. CPXV-infizierte (MOI = 5) 3D- und 2D-kultivierte Vero E6-Zellen wurden 4 h (A), 8 h (B) und 18 h (C) nach Infektion fixiert und für fluoreszenzmikroskopische Analysen präpariert. Um das Fortschreiten der Infektion sowie den sich ausbildenden zytopathischen Effekt über die Zeit zu dokumentieren, wurde das vom rekombinanten CPXV exprimierte GFP-Signal (grün) (2 + 4) analysiert und eine DAPI-Kernfärbung für die 3D-Kulturen (blau) (1) bzw. eine Durchlichtanalyse für die 2D-Kulturen (3) durchgeführt. Maßstabsbalken: 100 μm.

Die Signalintensitäten waren gering und es waren jeweils weniger als die Hälfte aller Zellen GFPpositiv (Abb. 21 B.2 + B.4). Nach 18 h waren bei allen Präparaten kultivierungsunabhängig sämtliche Zellen infiziert und zeigten eine deutliche Steigerung der GFP-Intensität gegenüber dem vorherigen Zeitpunkt (Abb. 21 C.2 + C.4). Eine Änderung der Zellmorphologie infolge der CPXV-Infektion war in der 3D-Kultur über die vollen 18 h nicht zu erkennen (Abb. 21 A.1 – C.1), wohingegen in der Monolayer-Kultur bereits nach 8 h ein starkes Abkugeln der Zellen zu beobachten war, welches auch nach 18 h weiterhin Bestand hatte (Abb. 21 A.3 – C.3).

Für eine detaillierte Analyse der Virusreifung und der Viruslast pro Zelle innerhalb der 3D-Kultur wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von CPXV-infizierten Vero E6-Zellen 7 Tage p.i. (MOI = 0,01) erstellt. In den teils sehr stark infizierten Zellen konnten ausgeprägte Virusfabriken (VF) mit nicht-gereiftem Virusmaterial sowie große Akkumulationen von Viren unterschiedlicher Reifungsgrade detektiert werden (Abb. 22). Zu differenzieren waren alle relevanten Zwischenformen intrazellulärer Virionen. Neben den halbmondförmigen, sich zusammenschließenden crescent-Formen und den daraus resultierenden unreifen Viren (IV) waren zudem die infektiösen Formen der intrazellulären gereiften Virionen (IMV) und der intrazellulären umhüllten Virionen (IEV) detektierbar. Extrazelluläre, membranassoziierte Viren (EEV und CEV) waren in den analysierten Präparaten nur vereinzelt, eine Übertragung dieser Formen von Zelle zu Nachbarzelle gar nicht zu identifizieren.



Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der CPXV-Reifung in 3D-kultivierten Vero E6-Zellen. CPXV-infizierte (MOI = 0,01) Vero E6 3D-Präparate wurden 7 Tage *p.i.* fixiert und für elektronenmikroskopische Analysen präpariert. Um den kompletten intrazellulären Reifungsprozess der Viren abzudecken, wurden die Zellen sowohl auf Virusfabriken (VF) als auch auf die verschiedenen Virionenformen analysiert. Dargestellt ist unter anderem ein intrazellulär umhülltes Virion (IEV) im Umhüllungsprozess. C: *crescent form* (Halbmondform), IV: *immature virion* (unreifes Virion), IMV: *intracellular mature virion* (intrazelluläres reifes Virion), IEV: *intracellular enveloped virion* (intrazelluläres umhülltes Virion), N: Nukleus, VF: Virusfabrik. Maßstabsbalken: 1 µm (Übersicht), 100 nm (Detailansichten).

Die Zellkulturmodell-abhängige Analyse der CPXV-Infektion von Vero E6-Zellen auf molekularer Ebene erfolgte mittels Nukleinsäure-, Protein- und Viabilitätsuntersuchungen. Die Replikation des viralen Genoms in 3D-Kultur erfolgte sowohl bei hoher als auch bei niedriger initialer Viruslast zu allen getesteten Zeitpunkten auf einem geringeren Niveau als in der Monolayer-Kultur (Abb. 23 A). Bei einer MOI von 5 wurde intrazellulär in beiden Modellen die maximale Zahl von CPXV Genomäquivalenten 8 h p.i. detektiert und 18 h p.i. konnte keine Veränderung dieses Levels festgestellt werden. Während die Infektion mit einer MOI von 0,01 zu einer sukzessiven Steigerung der zu detektierenden GE von 24 bis 96 h p.i. in 3D-Kultur führte, wurde das Maximum viraler Replikation in Monolayer-Kultur bereits 72 h p.i. erreicht und fiel weitere 24 h später wieder leicht ab. Die Expression pockenviraler mRNA am Beispiel des späten CPXV086-Transkripts war in beiden Modellen bei beiden Infektionssetups auf vergleichbarem Niveau (Abb. 23 B). Bei einer MOI von 5 wurde das Maximum 18 h p.i. erreicht, wobei dieses in Monolayer- gegenüber der 3D-Kultur etwas erhöht war. Bei niedriger initialer Viruslast wurde der Maximalwert der viralen mRNA des späten Virustranskripts im 3D-Modell bereits 24 h p.i. detektiert und blieb über den gesamten Infektionszeitraum konstant. In Monolayer-Kultur korrelierte der Verlauf der mRNA-Expression mit der Bildung viraler GE: nach einem Maximum bei 72 h p.i. fiel die Expression nach 96 h wieder ab. Die Zellviabilität war bei einer hohen initialen Viruslast in beiden Modellen bis 8 h p.i. nahezu unbeeinflusst (Abb. 23 C). Einer Verminderung der Viabilität 18 h p.i. um ca. 25 % in 3D-Kultur stand dagegen eine weiterhin unveränderte Viabilität in Monolayer-Kultur gegenüber.



Abb. 23: Analyse von CPXV-Infektionskinetiken in 3D- und Monolayer-kultivierten Vero E6-Zellen auf Nukleinsäure- und Proteinebene. Um das Fortschreiten der CPXV-Infektion in 3D- und 2D-Vero E6-Zellkulturen unter verschiedenen Anfangsbedingungen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden die Zellen entweder mit einer MOI von 5 oder 0,01 infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten zur Analyse auf Nukleinsäure- (n = 2) und Proteinebene (n = 1) sowie zur Bestimmung der infektionsabhängigen Zellviabilität (n = 2) aus der Kultur genommen. Auf Virusebene wurden mittels qPCR die Genomäquivalente (GE) (A) und die Genexpression anhand des späten Gens *CPXV086 (I7L)* (B) ermittelt und auf zelluläre *MYC*-Nukleinsäuren normiert. Die Zellviabilität (C) der infizierten Präparate wurde auf die jeweiligen uninfizierten Kontrollen normiert und als relativer Wert angegeben. Zudem wurde mittels Western Blot (10 µg Protein pro Spur) die Expression des frühen viralen Proteins CPXV168 (A33) und des zellulären Referenzgens Beta Actin (Actin) bei hoher (D) und niedriger (E) initialer Viruslast analysiert.
Bei einer MOI von 0,01 konnte in Monolayer-Kultur nach einer geringfügigen Verminderung der Viabilität während der ersten 72 h *p.i.* an Tag 4 *p.i.* nur noch eine Viabilität von < 2 % nachgewiesen werden, im 3D-Modell waren zu diesem Zeitpunkt dagegen noch etwa 83 % aller Zellen viabel. Sieben Tage nach Infektion betrug die Viabilität in der 3D-Kultur noch 50 %, in Monolayer-Kultur lag sie bei < 1 %. Auf Proteinebene konnte bei einer MOI von 5 unter beiden Kultivierungsbedingungen das frühe virale Protein CPXV168 (A33) nach 8 h in geringer und nach 18 h in sehr hoher Intensität nachgewiesen werden (Abb. 23 D). Die Proteinexpression bei geringer initialer Viruslast konnte in Monolayer-Kultur nach 24 h in deutlich geringerer Intensität als an den drei Folgetagen detektiert werden, an denen sich die Intensität des Signals nicht mehr veränderte. Gleiches gilt für die 3D-Kultivierung mit der Ausnahme, dass 24 h *p.i.* kein CPXV168 detektiert werden konnte (Abb. 23 E). Generell war in jedem Setup zu jeder Zeit das jeweilige Virusproteinsignal in Monolayer-Kultur stärker ausgeprägt als bei der infizierten 3D-Kultur.

Um die Bildung infektiöser Einheiten (*plaque forming units*: PFU) in beiden Zellkulturmodellen zu analysieren, wurden sowohl Zelllysate als auch Überstände von infizierten Kulturen mittels Plaque-Assay getestet. Zudem wurden zu jedem Zeitpunkt die viralen GE per qPCR bestimmt.



Abb. 24: Nachweis infektiöser Einheiten (PFU) für CPXV-Infektionskinetiken in 3D- und Monolayer-kultivierten Vero E6-Zellen. Als Nachweis der vollständigen Reifung und des Zellaustritts der CPXV wurden für 3D- und 2D-Kulturen sowohl intrazellulär (A) als auch im Überstand (C) unter verschiedenen Anfangsbedingungen der Infektion infektiöse Einheiten (PFU) mittels Plaque-Assay ermittelt und auf die durchschnittliche Zellzahl pro Ansatz normiert. Weiterhin wurden die PFU als Maß für die Effektivität der Virusreifung jeweils auf die über qPCR ermittelten viralen Genomäquivalente (GE) normiert (B + D). Alle Messungen erfolgten in biologischen Duplikaten.

Intrazellulär wurden bei hoher und niedriger initialer Viruslast in Monolayer-Kultur zu jedem Zeitpunkt bis auf 96 h *p.i.* (MOI = 0,01) mehr PFU pro Zelle detektiert als in 3D-Kultur. Die Maximal-PFU wurde in beiden Modellen 72 h *p.i.* erreicht (Abb. 24 A). In der 3D-Kultur war dagegen zu allen Zeitpunkten der Quotient der PFU zu viralen GE höher als in der Monolayer-Kultur, bei einer MOI von 0,01 sogar an allen Tagen etwa um den Faktor 10 (Abb. 24 B). Im Kulturüberstand waren bei hoher initialer Viruslast in beiden Modellen zu beiden Zeitpunkten ähnlich viele PFU pro Zelle detektierbar.

Bis auf Tag 1 *p.i.* (MOI = 0,01) korrelierten die Viruslasten in den Überständen mit denen der Zelllysate. Es wurden konstant etwa 40 Mal mehr PFU pro Zelle in Monolayer- als in 3D-Überständen detektiert und der jeweilige Höchstwert wurde 72 h *p.i.* erreicht (Abb. 24 C). Der Quotient aus PFU zu GE war – ähnlich wie in den Zelllysaten – zu jedem getesteten Zeitpunkt außer 24 h *p.i.* (MOI = 0,01) in 3D-Kultur deutlich gegenüber der Monolayer-Kultur erhöht (Abb. 24 D).

3.3.2. Infektion von primären humanen Zellen (NHEK)

Die Analysen der CPXV-Infektion in humanen Primärzellen erfolgten analog zu denen in Vero-Zellen.



Abb. 25: IHC/IFA-Aufnahmen der CPXV-Ausbreitung in 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK über 4 Tage bei niedriger initialer Viruslast. CPXV-infizierte (MOI = 0,01) 3D- und 2D-kultivierte NHEK wurden 48 h (A), 72 h (B) und 96 h (C) nach Infektion fixiert und für fluoreszenzmikroskopische Analysen präpariert. Um das Fortschreiten der Infektion sowie den sich ausbildenden zytopathischen Effekt über die Zeit zu dokumentieren, wurde das vom rekombinanten CPXV exprimierte GFP-Signal (grün) (2 + 4) analysiert und eine DAPI-Kernfärbung für die 3D-Kulturen (blau) (1) bzw. eine Durchlichtanalyse für die 2D-Kulturen (3) durchgeführt. Maßstabsbalken: 100 μm.

In 3D-Kultur konnte bei niedriger initialer Viruslast (MOI = 0,01) 48 h *p.i.* anhand des unter Viruskontrolle exprimierten GFPs eine Infektion in weniger als 10 % aller Zellen nachgewiesen werden (Abb. 25 A.2). Zum gleichen Zeitpunkt war die Infektionsrate in Monolayer-Kultur (2D) etwas weiter fortgeschritten, sodass ca. 20 % GFP-positive Zellen zu identifizieren waren (Abb. 25 A.4). 72 h *p.i.* waren in beiden Kultivierungsmodellen weniger als 20 % (3D) bzw. ca. 25 % (2D) infizierte Zellen zu detektieren (Abb. 25 B.2 + B.4). Nach 96 h stieg die Rate GFP-positiver Zellen auf ein ähnliches Level von etwa 50 % an (Abb. 25 C.2 + C.4). Während in Monolayer-Kultur schon 48 h *p.i.* ein zytopathischer Effekt zu identifizieren war, der über den gesamten Infektionszeitraum genau mit der Lokalisation des Virus-assoziierten GFP-Signals korrelierte (Abb. 25 A.3 – C.3), konnten in 3D-Kultur über den gesamten Zeitraum keine infektionsabhängigen morphologischen Veränderungen detektiert werden (Abb. 25 A.1 – C.1).

Bei einer hohen initialen Viruslast (MOI = 5) konnte in 3D-Kultur erst 18 h *p.i.* ein Fluoreszenzsignal des spät exprimierten GFPs bei weniger als 20 % aller Zellen detektiert werden (Abb. 26 B.2). Im Gegensatz dazu waren in Monolayer-Kultur 8 h *p.i.* bereits etwa 10 % und 18 h *p.i.* sämtliche Zellen GFP-positiv (Abb. 26 B.4 + C.4).



Abb. 26: IHC/IFA-Aufnahmen der CPXV-Ausbreitung in 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK über 18 Stunden bei hoher initialer Viruslast. CPXV-infizierte (MOI = 5) 3D- und 2D-kultivierte NHEK wurden 4 h (A), 8 h (B) und 18 h (C) nach Infektion fixiert und für fluoreszenzmikroskopische Analysen präpariert. Um das Fortschreiten der Infektion sowie den sich ausbildenden zytopathischen Effekt über die Zeit zu dokumentieren, wurde das vom rekombinanten CPXV exprimierte GFP-Signal (grün) (2 + 4) analysiert und eine DAPI-Kernfärbung für die 3D-Kulturen (blau) (1) bzw. eine Durchlichtanalyse für die 2D-Kulturen (3) durchgeführt. Maßstabsbalken: 100 μm.

Eine Änderung der Zellmorphologie infolge der CPXV-Infektion war in 3D-Kultur über die vollen 18 h nicht zu erkennen (Abb. 26 A.1 – C.1), wohingegen in der Monolayer-Kultur bereits nach 8 h ein Abkugeln infizierter Zellen festgestellt werden konnte, welches auch 18 h *p.i.* weiterhin Bestand hatte (Abb. 26 A.3 – C.3).

Eine Analyse der Virusreifung und -vermehrung in Perikard-Kultur auf hochauflösender Ebene durch Transmissionselektronenmikroskopie wurde in CPXV-infizierten NHEK 48 h *p.i.* (MOI = 0,01) durchgeführt. In den teils sehr stark infizierten Zellen konnten ausgeprägte Virusfabriken (VF) mit nicht-gereiftem Virusmaterial sowie große Akkumulationen von Viren unterschiedlicher Reifungsgrade detektiert werden (Abb. 27). Zu differenzieren waren alle relevanten Zwischenformen intrazellulärer Virionen, jedoch waren nicht alle Formen parallel in einer Zelle detektierbar.



Abb. 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der CPXV-Reifung in 3D-kultivierten NHEK. CPXV-infizierte (MOI = 0,01) NHEK 3D-Präparate wurden 2 Tage *p.i.* fixiert und für elektronenmikroskopische Analysen präpariert. Um den kompletten intrazellulären Reifungsprozess der Viren abzudecken, wurden die Zellen sowohl auf Virusfabriken (VF) als auch auf die verschiedenen Virionenformen analysiert. C: *crescent form* (Halbmondform), IV: *immature virion* (unreifes Virion), IMV: *intracellular mature virion* (intrazelluläres reifes Virion), IEV: *intracellular enveloped virion* (intrazelluläres umhülltes Virion), N: Nukleus, VF: Virusfabrik. Maßstabsbalken: 1 µm (Übersichten), 100 nm (Detailansichten).

Die halbmondförmigen, sich zusammenschließenden *crescent*-Formen und die daraus resultierenden unreifen Viren (IV) waren in Zellen identifizierbar, die sich in frühen Infektionsstadien befanden und morphologisch meist gut intakt waren (Abb. 27 A). Die infektiösen Formen der intrazellulären gereiften Virionen (IMV) und der intrazellulären umhüllten Virionen (IEV) waren hauptsächlich in Zellen detektierbar, deren physiologische Integrität scheinbar bereits vermindert war (Abb. 27 B). Extrazelluläre, membranassoziierte Viren (EEV und CEV) waren in den analysierten Präparaten nur vereinzelt, eine Übertragung dieser Formen von Zelle zu Nachbarzelle gar nicht zu identifizieren.

Die Replikation des viralen Genoms im 3D-Modell erfolgte bei hoher initialer Viruslast 8 h und 18 h *p.i.* auf einem um etwa eine log-Stufe geringeren Niveau als in der Monolayer-Kultur (Abb. 28 A). In beiden Modellen wurde die maximale Zahl von CPXV GE 8 h *p.i.* detektiert und 18 h *p.i.* konnte eine Abnahme dieses Levels festgestellt werden. Während die Infektion mit einer MOI von 0,01 zu einer sukzessiven Steigerung der zu detektierenden GE von 24 bis 96 h *p.i.* in 3D-Kultur führte, wurde das Maximum viraler Replikation in Monolayer-Kultur bereits 72 h *p.i.* erreicht und blieb weitere 24 h später konstant. Die Expression pockenviraler *CPXV086* mRNA war in 3D-Kultur bei einer MOI von 5 auf einem durchgehend niedrigerem und bei einer MOI von 0,01 auf einem konstant höheren Niveau als in Monolayer-Kultur (Abb. 28 B). In beiden Modellen und für beide Infektionssetups steigerte sich die mRNA-Expression sukzessiv über den Kultivierungszeitraum und erreichte das Maximum am jeweils letzten Analysezeitpunkt.



Abb. 28: Analyse von CPXV-Infektionskinetiken in 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK auf Nukleinsäure- und Proteinebene. Um das Fortschreiten der CPXV-Infektion in 3D- und 2D-NHEK-Kulturen unter verschiedenen Anfangsbedingungen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden die Zellen entweder mit einer MOI von 5 oder 0,01 infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten zur Analyse auf Nukleinsäure- und Proteinebene sowie zur Bestimmung der infektionsabhängigen Zellviabilität aus der Kultur genommen. Die Zellviabilität (C) der infizierten Präparate wurde auf die jeweiligen uninfizierten Kontrollen normiert und als relativer Wert angegeben. Auf Virusebene wurden mittels qPCR die Genomäquivalente (GE) (A) und die Genexpression anhand des späten Gens *CPXV086 (17L)* (B) ermittelt und auf zelluläre *MYC*-Nukleinsäuren normiert. Zudem wurde mittels Western Blot (10 µg Protein pro Spur) die Expression des frühen viralen Proteins CPXV168 (A33) und des zellulären Referenzgens Beta Actin (Actin) bei hoher (D) und niedriger (E) initialer Viruslast analysiert.

Die infektionsabhängige Veränderung der Zellviabilität in Monolayer-Kultur korrelierte negativ mit der Expression viraler mRNA und fiel somit in beiden Infektionssetups sukzessiv über den Infektionszeitraum ab (Abb. 28 C). Im Gegensatz dazu stieg die Viabilität in 3D-Kultur bei einer MOI von 5 8 h *p.i.* um > 30 % und fiel 18 h *p.i.* auf 50 % des Kontrollwertes. Bei einer MOI von 0,01 konnte in 3D-Kultur nach einer Verminderung der Viabilität 48 h *p.i.* um > 50 % im weiteren Infektionsverlauf bis 96 h *p.i.* keine weitere erhebliche Abnahme detektiert werden. Auf Proteinebene konnte bei einer MOI von 5 unter beiden Kultivierungsbedingungen das frühe virale Protein CPXV168 (A33) erst 18 h *p.i.* detektiert werden (Abb. 28 D). In 3D-Kultur war die Intensität des Signals jedoch deutlich geringer als in Monolayer-Kultur. Die Proteinexpression bei geringer initialer Viruslast stieg in Monolayer-Kultur sukzessiv über 72 h an und verblieb 96 h *p.i.* auf einem ähnlichen Niveau (Abb. 28 E). In der 3D-Kultur wurde CPXV168 erstmals 48 h *p.i.* detektiert. Nach dem Erreichen der maximalen Signalintensität 72 h *p.i.* fiel die Expression 96 h *p.i.* leicht ab. Generell war in jedem Setup zu jeder Zeit das jeweilige Virusproteinsignal in Monolayer-Kultur stärker ausgeprägt als bei der infizierten 3D-Kultur mit Ausnahme vom Zeitpunkt 48 h *p.i.* (MOI = 0,01), an dem die Signale von vergleichbarer Intensität waren.



Abb. 29: Nachweis infektiöser Einheiten (PFU) für CPXV-Infektionskinetiken in 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK. Als Nachweis der vollständigen Reifung und des Zellaustritts der CPXV wurden für 3D- und 2D-Kulturen sowohl intrazellulär (A) als auch im Überstand (C) unter verschiedenen Anfangsbedingungen der Infektion infektiöse Einheiten (PFU) mittels Plaque-Assay ermittelt und auf die durchschnittliche Zellzahl pro Ansatz normiert. Weiterhin wurden die PFU als Maß für die Effektivität der Virusreifung jeweils auf die über qPCR ermittelten viralen Genomäquivalente (GE) normiert (B + D). Alle Messungen erfolgten mit biologischen Duplikaten.

Bei hoher initialer Viruslast waren intrazellulär 8 h *p.i.* zunächst vergleichbare infektiöse Virustiter in beiden Zellkulturmodellen detektierbar. Jedoch konnten 18 h *p.i.* etwa 100 Mal mehr infektiöse Einheiten (PFU) pro Zelle in Monolayer-Kultur detektiert werden als in 3D-Kultur (Abb. 29 A). Bei einer MOI von 0,01 wurde in beiden Modellen eine sukzessive Steigerung der zu detektierenden PFU pro Zelle bis 72 h *p.i.* erzielt, die bis auf den Zeitpunkt 24 h *p.i.* auf einem vergleichbaren Niveau verlief. Der Quotient der PFU zu viralen GE war intrazellulär in 3D-Kultur zu jedem Messpunkt höher als in der Monolayer-Kultur, bei einer MOI von 0,01 sogar an allen Tagen etwa um den Faktor 10 (Abb. 29 B). Im Kulturüberstand war bei hoher initialer Viruslast in 3D-Kultur ein starker Abfall der PFU von 8 h zu 18 h *p.i.* um etwa drei log-Stufen zu verzeichnen, wohingegen in Monolayer-Kultur an beiden Messpunkten ein gleichbleibender Titer zu detektieren war (Abb. 29 C). Bei einer MOI von 0,01 stiegen die Viruslasten in den Überständen in beiden Modellen sukzessiv bis 72 h *p.i.* und verblieben 96 h *p.i.* auf dem gleichen Level. Der Quotient aus PFU zu GE korrelierte mit den Ergebnissen aus den Zelllysaten und war vor allem bei einer MOI von 0,01 zu jedem getesteten Zeitpunkt in 3D-Kultur deutlich gegenüber der Monolayer-Kultur erhöht (Abb. 29 D).

3.4. Analysen auf Transkriptomebene

Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Charakterisierungsversuchen von CPXV-Infektionen in primären humanen Keratinozyten (NHEK), wurden für die Analysen auf Transkriptomebene mittels *next generation sequencing* (NGS) die Zeitpunkte ausgewählt, die für die jeweilige Fragestellung am relevantesten erschienen. Für das NGS wurden für jeden analysierten Zeitpunkt der Infektion auch die jeweils entsprechenden nicht-infizierten und für die gleiche Zeit in Kultur gehaltenen Kontrollen kultiviert und präpariert. Sämtliche Analysen erfolgten in biologischen Triplikaten. Die Auswahlkriterien für die jeweils gewählten Analysezeitpunkte werden in den jeweiligen nachfolgenden Kapiteln konkretisiert.

3.4.1. Charakterisierung von Sekundärinfektionen von CPXV in NHEK

Nach einer Vorkultivierungszeit der NHEK von sieben Tagen in 3D-Kultur und von drei Tagen in Monolayer-Kultur, nach der in beiden Kultivierungsmodellen auf Grundlage der Vorversuche eine vollständige Konfluenz der Zellen zu erwarten war, wurden die Präparate mit CPXV mit einer MOI von 0,01 infiziert und 48 h *p.i.* für die Transkriptomanalyse präpariert. 48 h *p.i.* zeichnete sich in den Voranalysen als ein geeigneter Punkt für Charakterisierungen von Sekundärinfektionen aus, da zu diesem Zeitpunkt sowohl auf Protein- als auch vor allem auf mRNA-Ebene noch kein Plateau innerhalb der Infektionskinetiken erreicht war (Abb. 28 B + E) und somit eine fortschreitende Ausbreitung der Infektion von Zellen zu Nachbarzellen als wahrscheinlich angenommen wurde. Unterstützt wurde diese Annahme durch die IHC- und IFA-Analysen (Abb. 25). Neben den jeweils infizierten 3D- und Monolayer-Kulturen (n = 3), wurden auch die jeweiligen uninfizierten Kontrollen (KO; n = 3) präpariert, sodass insgesamt zwölf Präparate für das NGS verwendet wurden.

Probe	RIN	Reads total	Reads CPXV	Aligniert [%]	Abdeckung [%]	Abdeckungstiefe	Qualität ø	Komplett in Exon [%]
2D CPXV 1	9.3	1.4E+07	1.1E+06	7.6	100.0	888.9	34.9	80.3
2D CPXV 2	9.2	2.1E+07	2.3E+06	11.1	100.0	1875.2	34.7	81.8
2D CPXV 3	9.2	1.6E+07	1.9E+06	11.8	100.0	1514.7	35.1	82.2
3D CPXV 1	9.2	1.4E+07	1.2E+06	8.7	100.0	958.8	35.0	80.4
3D CPXV 2	9.1	1.3E+07	1.8E+06	13.4	100.0	1448.3	34.9	81.1
3D CPXV 3	9	1.7E+07	7.3E+05	4.3	100.0	591.1	35.0	81.1

Tab. 18: Qualität der NGS-Proben und Alignierung der generierten Reads auf das CPXV-Genom

Vor der Sequenzierung der mRNA wurde deren Qualität am Bioanalyzer bestimmt. Für sämtliche Proben konnte so ein RNA-Integritätswert (RIN) von > 9 ermittelt werden, was einer sehr gut intakten, wenig degradierten mRNA entspricht (Tab. 18). Nach der Sequenzierung und ersten Datenprozessierung wurden die Daten mit der Software Partek Flow gemäß eines selbstentwickelten Ablaufs (Abb. 9) weiterprozessiert, ggf. gegen das Kuhpockengenom und für jeden Vergleich gegen das humane Genom aligniert und vergleichende Analysen der verschiedenen Gruppen durchgeführt.

72

Exemplarisch wurden in Tab. 18 die Ergebnisse der Alignierung der infizierten 3D- und Monolayer-Proben (2D CPXV + 3D CPXV) gegen das CPXV-Genom dargestellt. Von den insgesamt erhaltenen Reads wurden zwischen 4,3 und 13,4 % dem viralen Genom zugeordnet, was für jede Probe zu einer kompletten Abdeckung des Genoms führte. Die Abdeckungstiefe des Virusgenoms lag zwischen 600 und 1900 und die Qualität der erhaltenen Reads bei durchschnittlich 35, was einer sequenzierungsbedingten Fehlerrate von 3 zu 10.000 (0,03 %) innerhalb der 100 bp Reads entspricht. Diese Reads konnten für jede Probe zu 80 % komplett einem Exon zugeordnet und somit für die Expressionsanalyse verwendet werden. Im Mittel 92,5 % der nicht erfolgreich alignierten und somit verbleibenden Reads konnten im Folgenden dem humanen Genom (hg19) zugeordnet werden (Tab. 19). Bei einer Abdeckungstiefe von 14 bis 28 konnten bei Monolayer-Kulturen durchschnittlich 3,5 % und bei 3D-Kulturen 4,1 % vom kompletten Genom abgedeckt werden. Die Qualität der Reads lag bei durchschnittlich 33,5, was einer Fehlerrate von 0,04 % entspricht. Zwischen 45 und 48 % der alignierten Reads konnten anschließend komplett einem humanen Exon zugeordnet werden.

Probe	RIN	Reads verbleibend	Reads Human	Aligniert [%]	Abdeckung [%]	Abdeckungstiefe	Qualität ø	Komplett in Exon [%]
2D CPXV 1	9.3	1.3E+07	1.2E+07	92.4	3.5	19.0	33.5	47.9
2D CPXV 2	9.2	1.9E+07	1.7E+07	92.5	3.3	28.2	33.2	48.4
2D CPXV 3	9.2	1.4E+07	1.3E+07	92.8	3.7	19.0	33.9	46.9
3D CPXV 1	9.2	1.2E+07	1.1E+07	92.4	4.1	15.0	33.5	45.8
3D CPXV 2	9.1	1.2E+07	1.1E+07	92.4	4.1	14.2	33.7	46.5
3D CPXV 3	9	1.6E+07	1.5E+07	92.9	4.2	19.6	33.7	45.3

Anhand der komplett den Exons zugeordneten Reads wurde mit Partek Flow abschließend eine differentielle Genexpressionsanalyse zwischen jeweils zwei Gruppen von Proben durchgeführt. Am Beispiel der CPXV-infizierten 3D- und Monolayer-Proben ist in einem Volcano-Plot eine typische Verteilung der etwa 15500 humanen Gene dargestellt, die mit einer Mindestzahl von zehn Reads detektiert werden konnten (Abb. 30 A). Während in 3D-Kultur verglichen mit der Monolayer-Kultur 3870 Gene signifikant höher und 1449 Gene weniger stark exprimiert waren (p-Wert < 0,05 und FC > |2|), war die Vielzahl der detektierten Gene nicht signifikant reguliert. Von den CPXV Genen waren drei Gene signifikant höher und keines weniger stark exprimiert (Abb. 30 B). Bei den höher exprimierten Virusgenen handelte es sich um die frühen Transkripte CGF (cowpox growth factor; CPXV021), CPXV192 und CPXV197. Die statistische Auswertung aller humanen Gene mit > 100 Reads ergab, dass in der infizierten 3D- gegenüber der korrespondierenden 2D-Kultur ca. 12 % aller Transkripte höher und 4 % weniger stark exprimiert waren (Abb. 30 C). Durch einen Abgleich mit der Analyse der differentiellen Genexpression von nicht infizierten 3D- und Monolayer-Präparaten konnte gezeigt werden, dass 47 % dieser höher und 35 % dieser weniger stark exprimierten Gene ausschließlich der Infektion und nicht bereits der unterschiedlichen Kultivierungsmethode zuzuordnen waren.

Die Zellkulturmodell-internen differentiellen Genexpressionsanalysen ergaben, dass in Monolayer-Kultur durch die CPXV Infektion 2,3 % aller humanen Gene signifikant hoch- und 6,4 % herunterreguliert wurden, in 3D-Kultur dagegen nur ca. 0,2 % bzw. 0,04 % (Abb. 30 D). Allein durch die Kultivierung der NHEK in unterschiedlichen Zellkulturmodellen waren 11 % aller Gene in 3D-Kultur höher und 6 % weniger stark exprimiert als im Monolayer (3D KO vs. 2D KO).



Differentielle Genexpression: 3D CPXV vs 2D CPXV

Abb. 30: Transkriptomanalyse von CPXV-infizierten 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK bei niedriger initialer Viruslast. 48 Stunden nach Infektion mit CPXV (MOI = 0,01) wurden infizierte Proben und entsprechende Kontrollen (KO) aus 3D- und 2D-Kultur (jeweils n = 3) für eine Transkriptomanalyse mittels HiSeq-Plattform (Illumina) präpariert. Die Ergebnisse der differentiellen Genexpression zwischen infizierten 3D- und 2D-Kulturen wurden in Volcano-Plots für die zellulären (A) und die viralen (B) Gene dargestellt. In diesen Diagrammen werden alle signifikant hochregulierten Gene als rote und alle signifikant herunterregulierten Gene als grüne Punkte dargestellt, wobei ein p-Wert von < 0,05 und ein *Fold Change* (FC) von > |2| als Grenzen gewählt wurden. Weiterhin sind die statistischen Auswertungen sowohl für den Vergleich der infizierten Proben (C) als auch für alle weiteren möglichen Vergleiche innerhalb des Laufs (inklusive der jeweiligen uninfizierten Kontrollen) (D) in Tabellen aufgeführt. Als hoch- bzw. herunterregulierte Gene wurden hier alle Gene mit einem korrigierten p-Wert (FDR: *false discovery rate*) von < 0,05, einer Readzahl von > 100 und einem FC von > |2| erfasst.

Durch die Eingruppierung der jeweils signifikant regulierten Gene aus der Transkriptomanalyse in sogenannte GO-Terms (GO: *gene ontology*) wurden biologische Prozesse identifiziert, die auf den unterschiedlichen Vergleichsebenen beeinflusst waren. Beim Vergleich der uninfizierten 3D- und Monolayer-Präparate waren im 3D-Modell neben der Zelldifferenzierung vor allem DNA-assoziierte Prozesse und Prozesse der Immunantwort signifikant überrepräsentiert (Abb. 31 A). Der Vergleich der Gene, die ausschließlich während einer CPXV-Infektion und nicht bereits in den uninfizierten Kontrollen zwischen beiden Kultivierungsbedingungen differentiell exprimiert waren, zeigte in 3D-Kultur ebenfalls eine signifikante Überrepräsentation von Differenzierungsprozessen und zusätzlich von katabolischen Prozessen des Lipidstoffwechsels (Abb. 31 B).

In beiden Modellen konnte durch die Infektion eine Hochregulation von stressassoziierten und Stimuli-induzierten Genen detektiert werden (Abb. 31 C + D). Während in 3D-Kultur zudem Prozesse rund um die Signaltransduktion, die Verhinderung der Apoptose und das Immunsystem hochreguliert waren, waren im Monolayer vor allem die Zellteilung und Umstrukturierungsprozesse von Mikrotubuli signifikant reguliert.



Abb. 31: GO-Term Analyse der hochregulierten Gene aus der Transkriptomanalyse (CPXV, MOI = 0,01). Alle signifikant hochregulierten Gene (> 100 Reads, FDR < 0,05, FC > 2) aus der vergleichenden Transkriptomanalyse von 3D- und 2D-NHEK-Kulturen wurden mittels BiNGO-Tool (Cytoscape) in sogenannte GO-Terms (GO: gene ontology) eingruppiert. Der p-Wert und somit die Signifikanz eines so ermittelten regulierten biologischen Prozesses für den jeweils betrachteten Vergleich ist in diesem Zusammenhang abhängig von der Anzahl der Gene, die einem solchen Cluster zugeordnet wurden und von der Überrepräsentation der zugeordneten Gene innerhalb der analysierten Genliste gegenüber der theoretisch auftretenden Wahrscheinlichkeit einer Zuordnung zum entsprechenden GO-Term. Aufgeführt sind neben ausgewählten GO-Terms für die verschiedenen Vergleiche zwischen uninfizierten und CPXV-infizierten 3D- und 2D-Kulturen (A + B) und den Zellkulturmodell-internen Vergleichen der infizierten und uninfizierten Präparate (C + D) auch Beispielgene für die jeweiligen GO-Terms. KO: Kontrolle. FDR: false discovery rate. FC: *Fold Change*.

Um die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zu verifizieren, wurden zehn Gene anhand verschiedener Kriterien ausgewählt und deren Expression in den gleichen Proben mit kommerziellen qPCR Assays analysiert. Zu den Auswahlkriterien gehörte neben einem hohen *Fold Change* (FC) und dem Signifikanzlevel (FDR < 0,001) der differentiellen Expression auch die absolute Expressionsstärke (> 1000 Reads) sowie die biologische Relevanz der Gene. Zudem sollten Antikörpern für eine weiterführende Analyse auf Proteinebene erhältlich sein. Die Gene *CASP14, CALML5, RNASE7, DSC1* und *IL1R2* wurden aufgrund ihrer Hochregulation und *DDIT3* wegen der Herabregulation im Vergleich der nicht-infizierten Kontrollen (3D KO vs. 2D KO) ausgewählt. *MAT2A, MIR22HG* und *DGCR8 wurden* wegen der Hochregulation bzw. *HSPA1B* wegen der Herabregulation im Vergleich der infizierten Präparate (3D CPXV vs. 2D CPXV) gewählt. Im Vergleich der nicht-infizierten Präparate konnte für alle Gene die differentielle Expression aus der Transkriptomanalyse mittels qPCR bestätigt werden (Abb. 32 A). Die Genexpressionsanalyse der infizierten Präparate mit qPCR lieferte für alle im 3D-Modell hochregulierten Gene *DDIT3* und *HSPA1B* konnte nur die Tendenz bestätigt werden (Abb. 32 B).



Abb. 32: qPCR-Verifizierung der Expression differentiell exprimierter Gene aus der Transkriptomanalyse (CPXV, MOI = 0,01). Die differentielle Expression einer Auswahl signifikant regulierter Gene (p < 0,001) aus der vergleichenden Transkriptomanalyse von uninfizierten (A) und CPXV-infizierten (B) 3D- und 2D-NHEK-Kulturen wurde mittels qPCR verifiziert (n = 3). Dargestellt sind neben den *Fold Changes* (FC) aus der Transkriptomanalyse die log(2)-fachen und auf das zelluläre Referenzgen *MYC* normierten qPCR-ermittelten relativen Expressionen der untersuchten Gene im jeweiligen Vergleichskontext. *: p < 0,05. **: p < 0,01. ***: p < 0,001. NGS: Next Generation Sequencing. KO: Kontrolle.

Neben der Bestätigung der Transkriptomdaten durch qPCR Analysen wurde die Expression ausgewählter Targets auch mittels IHC/IFA auf Proteinebene im gleichen Infektionssetup analysiert. In 3D-Kultur war - analog zu den Ergebnissen aus der Transkriptomanalyse - eine im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen geringere Expression von CASP14 in infizierten Zellen zu detektieren (Abb. 33 A.2). Das laut Transkriptomanalyse nicht-signifikant regulierte HSPA1B war auf Proteinebene in CPXV-infizierten Präparaten deutlich hochreguliert und konnte vor allem in stark infizierten Bereichen der 3D-Zellkulturen detektiert werden (Abb. 33 B.2). Die durch CPXV induzierte verstärkte Expression von MMP1, IL1R2 und NR4A1 konnte mittels IHC bestätigt werden. Während von MMP1 und NR4A1 diskrete Foci außerhalb der Zellen detektiert wurden (Abb. 33 C.2 + E.2), war IL1R2 innerhalb infizierter Zellen lokalisiert (Abb. 33 D.2).



Abb. 33: Verifizierung der CPXV-abhängigen Expression differentiell regulierter Gene aus der Transkriptomanalyse von **3D-NHEK-Kulturen (MOI = 0,01) auf Proteinebene (IHC).** 3D-kultivierte NHEK wurden analog zum Setup der Proben aus der Transkriptomanalyse bis 48 h *p.i.* (MOI = 0,01) kultiviert und anschließend fixiert und für die IHC präpariert. Es wurde die Expression und Lokalisation der laut Transkriptomanalyse auf unterschiedliche Weise regulierten Proteine Caspase 14 (A), HSPA1B (B), MMP1 (C), IL1R2 (D) und NR4A1 (E) in CPXV-infizierten Präparaten und entsprechenden Kontrollen (KO) mikroskopisch analysiert. Infizierte Bereiche sind durch die CPXV-kodierte GFP-Expression (grün) zu erkennen, die Zielproteine sind gelb markiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Neben den Gennamen ist der jeweilige *Fold Change* (FC) vom Vergleich 3D CPXV vs. 3D KO aus der Transkriptomanalyse als Vergleichswert angegeben. Maßstabsbalken: 50 μm.

Eine CPXV Infektion im Monolayer führte auf Proteinebene zu einer verstärkten, in Foci auftretenden Expression von CASP14 im Zytoplasma infizierter Zellen und zu einer starken Expression auf den Membranen abgekugelter Zellen (Abb. 34 A.2). Im Gegensatz dazu war *CASP14* in der Transkriptomanalyse nicht signifikant reguliert. Für die während der Monolayer-Infektion laut Transkriptomdaten hochregulierten Gene *HSPA1B*, *MMP1*, *IL1R2* und *NR4A1* konnte auch mittels IFA jeweils eine starke Expression in infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 34 B.2 – E.2). Die Proteine HSPA1B, MMP1 und IL1R2 traten im Zytoplasma in Foci auf, NR4A1 konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden. Uninfizierte Kontrollpräparate waren für jedes der Proteine negativ (Abb. 34 B.3 – E.3).



Abb. 34: Verifizierung der CPXV-abhängigen Expression differentiell regulierter Gene aus der Transkriptomanalyse von 2D-NHEK-Kulturen (MOI = 0,01) auf Proteinebene (IFA). 2D-kultivierte NHEK wurden analog zum Setup der Proben aus der Transkriptomanalyse bis 48 Stunden nach CPXV-Infektion (MOI = 0,01) kultiviert und anschließend fixiert. Es wurde die Expression und Lokalisation der laut Transkriptomanalyse auf unterschiedliche Weise regulierten Proteine CASP14 (A), HSPA1B (B), MMP1 (C), IL1R2 (D) und NR4A1 (E) in CPXV-infizierten Proben und entsprechenden Kontrollen (KO) mikroskopisch analysiert. Infizierte Bereiche sind durch die CPXV-kodierte GFP-Expression (grün) zu erkennen, die Zielproteine sind gelb markiert. Die Proteinexpression in Einzelzellen ist für jedes Zielprotein in separaten Kästchen dargestellt. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Neben den Gennamen ist der jeweilige *Fold Change* (FC) vom Vergleich 2D CPXV vs. 2D KO aus der Transkriptomanalyse als Vergleichswert angegeben. Maßstabsbalken: 50 µm.

3.4.2. Charakterisierung von Primärinfektionen von CPXV in NHEK

Neben der Virusweitergabe von Zelle zu Nachbarzelle waren auch Primärinfektionen, also direkte CPXV Infektionen von Zellen durch Viren im Inokulat, Bestandteil der Untersuchungen auf Transkriptomebene. Hierfür wurden NHEK nach einer Vorkultivierung von sieben Tagen in 3D-Kultur und von drei Tagen in Monolayer-Kultur (analog zu 3.4.1) mit CPXV mit einer MOI von 5 infiziert und 4 bzw. 8 h *p.i.* und damit vor Beendigung eines kompletten Replikationszyklus für die Transkriptomanalyse präpariert. Diese Zeitpunkte wurden ausgewählt, um sowohl die Phase der frühen als auch der mittleren und späten viralen Genexpression zu umfassen und analysieren zu können. Die Datenprozessierung und -auswertung erfolgte gemäß des Vorgehens der Charakterisierung von Sekundärinfektionen (siehe 3.4.1).

Beim direkten Vergleich der infizierten 3D- und Monolayer-Kulturen war in 3D-kultivierten NHEK 4 h *p.i.* von den 229 CPXV Genen eines (0,4 %) höher und 43 (18,8 %) weniger stark exprimiert, 8 h *p.i.* dagegen 39 (17 %) höher und eines (0,4 %) niedriger exprimiert als im Monolayer (Abb. 35 A + B). Bei den zum frühen Zeitpunkt weniger stark exprimierten Genen handelte es sich vorrangig um intermediäre und späte virale Transkripte, die zum späten Zeitpunkt höher exprimierten Gene waren im Kontrast dazu zum Großteil frühe Gene (siehe Appendix, Abb. A 1). Abzüglich der Gene, die bereits in den uninfizierten Kontrollpräparaten differentiell exprimiert waren, waren von den humanen Genen 4 h *p.i.* in 3D-Kultur gegenüber der infizierten Monolayer-Kultur 312 höher und 166 weniger stark exprimiert. Zum Zeitpunkt 8 h *p.i.* waren für diesen Vergleich ähnlich viele Gene differentiell exprimiert (324 höher, 318 weniger).



Differentielle Genexpression: MOI = 5

Abb. 35: Transkriptomanalyse von CPXV-infizierten 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK bei hoher initialer Viruslast. 4 und 8 Stunden nach Infektion mit CPXV (MOI = 5) wurden infizierte Proben und entsprechende Kontrollen (KO) aus 3Dund 2D-Kultur (jeweils n = 3) für eine Transkriptomanalyse mittels HiSeq-Plattform (Illumina) präpariert. Dargestellt sind die statistischen Auswertungen der differentiellen Genexpression für den Vergleich der infizierten Proben der beiden Kultivierungsmodelle zu beiden Zeitpunkten (A + B) sowohl für virale als auch für zelluläre Gene. Weiterhin wurde zu beiden Zeitpunkten Zellkulturmodell-intern der Einfluss der CPXV-Infektion auf die Wirtszellgenexpression analysiert (C + D) und die uninfizierten Kontrollen der 3D- und 2D-Kulturen zum Zeitpunkt 8 h *p.i.* miteinander verglichen (E). Als hoch- bzw. herunterregulierte Gene wurden hier alle Gene mit einem korrigierten p-Wert (FDR: *false discovery rate*) von < 0,05, einer Readzahl von > 100 und einem FC von > |2| erfasst. FC: *Fold Change*.

Die Zellkulturmodell-internen Analysen der differentiellen Genexpression humaner Gene im Vergleich der CPXV-infizierten und uninfizierten Präparate zeigte zu beiden analysierten Zeitpunkten einen stärkeren Einfluss der Infektion in Monolayer-Kultur. Sowohl 4 h *p.i.* als auch 8 h *p.i.* waren jeweils etwa doppelt so viele humane Gene im Monolayer reguliert wie in der korrespondierenden 3D-Kultur (Abb. 35 C + D). Zudem war in beiden Kultivierungsmodellen ein stärkerer Einfluss zum späten Infektionszeitpunkt zu erkennen. 8 h *p.i.* waren jeweils etwa zwei Mal mehr Gene hochreguliert und ca. vier Mal (Monolayer) bzw. sechs Mal (3D) mehr Gene herunterreguliert als nach vier Stunden. Im Vergleich der uninfizierten Kontrollpräparate waren in 3D-Kultur gegenüber der Monolayer-Kultur 329 Gene höher und 83 Gene weniger stark exprimiert, was insgesamt einer differentiellen Expression von < 3 % aller humanen Gene in Abhängigkeit vom Kultivierungssystem entsprach (Abb. 35 E).

Die Identifikation biologischer Prozesse, die durch die verschiedenen Kultivierungsbedingungen bzw. durch die CPXV-Infektion beeinflusst wurden, erfolgte mittels Eingruppierung der differentiell exprimierten Gene in GO-Terms. Der Vergleich uninfizierter 3D- und Monolayer Kontrollpräparate zeigte für die 3D-Kultur erneut (vgl. Abb. 31 A) eine starke Überrepräsentation von Genen, die mit der Epidermisentwicklung und vor allem der Keratinozytendifferenzierung assoziiert sind (Abb. 36 A).



Abb. 36: GO-Term Analyse der hochregulierten Gene aus der Transkriptomanalyse (CPXV, MOI = 5). Alle signifikant hochregulierten Gene (> 100 Reads, FDR < 0,05, FC > 2) aus der vergleichenden Transkriptomanalyse von 3D- und 2D-NHEK-Kulturen wurden mittels BiNGO-Tool (Cytoscape) in sogenannte GO-Terms eingruppiert. Der p-Wert und somit die Signifikanz eines so ermittelten regulierten biologischen Prozesses ermitteln sich wie in Abb. 31 und in den Methoden (2.18.4) beschrieben. Aufgeführt sind neben ausgewählten GO-Terms für den Vergleich der uninfizierten 3D- und 2D-Kulturen (A) und den Zellkulturmodell-internen Vergleichen der infizierten und uninfizierten Präparate zu beiden Analysezeitpunkten (B - E) auch Beispielgene für die jeweiligen GO-Terms. FC: *Fold Change*. FDR: *false discovery rate*. KO: Kontrolle.

Weniger signifikant waren zudem Gene der zellulären Stressantwort, der Zelladhäsion und der Angiogenese im 3D-Modell stärker exprimiert als in der korrespondierenden Monolayer-Kultur. Die CPXV Infektion in 3D-Kultur führte an beiden untersuchten Zeitpunkten zu einer Hochregulation von Genen, die Einfluss auf die Proteinphosphorylierung haben und das Zellwachstum negativ beeinflussen (Abb. 36 B +C). Weiterhin waren 4 h *p.i.* Gene für Inflammation sowie Signaltransduktion und 8 h *p.i.* Gene für die Zellantwort auf organische Substanzen, Proteinfaltung und anti-apoptotische Prozesse während der Infektion überrepräsentiert. In der Infektion der Monolayer-Kultur waren hingegen zu beiden Zeitpunkten Gene hochreguliert, die mit der Regulation der Transkription assoziiert sind (Abb. 36 D + E). Während 4 h *p.i.* zudem zelluläre Antworten auf Proteinstimuli und Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) hochreguliert waren, standen zum späten Infektionszeitpunkt die Systementwicklung, die Zellantwort auf organische Substanzen sowie die Regulation der Zellkommunikation und Proliferation im Vordergrund.

Für die Identifikation spezifischer differentieller Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Zellkulturmodell, der CPXV Infektion oder dem Infektionszeitpunkt von NHEK bei Primärinfektionen wurden sämtliche Gene, die in 3D- oder in Monolayer-Kultur an beiden analysierten Zeitpunkten durch die Infektion hochreguliert waren, mittels Venny-Software miteinander verglichen und so auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede analysiert (Abb. 37 A). Die gleiche Analyse wurde auch für die herunterregulierten Gene durchgeführt (Abb. 37 B). 3D-spezifisch wurden zu beiden Zeitpunkten der Infektion 43 Gene hoch- und 7 Gene herunterreguliert. Im Monolayer waren dagegen deutlich mehr Gene exklusiv durch die Infektion beeinflusst (110 hoch, 117 herunter).



Abb. 37: Vergleich der CPXV-abhängigen differentiellen Genexpression in 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK aus der Transkriptomanalyse (MOI=5). Alle signifikant differentiell regulierten Gene (> 100 Reads, FDR < 0,05, FC > |2|) aus den verschiedenen Zellkulturmodell-internen Vergleichen von CPXV-infizierten Proben und den entsprechenden Kontrollen (KO) aus der Transkriptomanalyse wurden als Genlisten mit dem Venny-Tool 2.1 (BioinfoGP) untereinander verglichen. Dargestellt sind die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der möglichen Vergleiche zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl für hochregulierte (A) als auch für herunterregulierte (B) Gene. FC: *Fold Change*. FDR: *false discovery rate*.

32 Gene wurden in beiden Modellen spezifisch zum Zeitpunkt 4 h *p.i.* hoch- und 6 herunterreguliert. 8 h *p.i.* waren spezifisch 110 Gene hoch- und 486 herunterreguliert. Zudem wurden 197 Gene identifiziert, deren Expression unabhängig vom Zellkulturmodell und vom Infektionszeitpunkt durch eine CPXV Infektion reguliert wurde (95 hoch, 102 herunter).

3.4.3. Vergleich der Transkriptomanalysen

Um Gene zu identifizieren, die Zellkulturmodell-spezifisch in 3D- und in Monolayer-Kultur unabhängig von einer Infektion differentiell exprimiert werden, wurden alle signifikant höher und weniger stark exprimierten Gene aus den Vergleichen der uninfizierten NHEK-Präparate beider Transkriptomanalysen (siehe 3.4.1 und 3.4.2) mittels Venny-Software miteinander verglichen. Von allen Genen, die in 3D-kultivierten NHEK höher exprimiert waren als in Monolayer-Kultur, waren 124 (6,3 %) in beiden Läufen gemeinsam reguliert (Abb. 38 A). Eine GO-Term Analyse dieser Gene ergab eine signifikante Überrepräsentation von Transkripten, die in die Epidermisentwicklung und Keratinozytendifferenzierung involviert sind und zudem Einfluss auf die Angiogenese und die zelluläre Immunantwort haben (Abb. 38 C). Von allen in 3D-Kultur im Vergleich zum Monolayer weniger stark exprimierten Genen waren nur 10 Gene (0,9 %) zu beiden Zeitpunkten gemeinsam reguliert (Abb. 38 B). Eine GO-Term Analyse dieser Bene insam reguliert (Abb. 38 B). Eine GO-Term Analyse dieser Bene insam reguliert (Abb. 38 B). Eine GO-Term Analyse dieser Bene insam reguliert (Abb. 38 B). Eine GO-Term Analyse dieser Bene insam reguliert (Abb. 38 B). Eine GO-Term Analyse dieser Bene insam reguliert (Abb. 38 B). Eine GO-Term Analyse dieser Bene insam reguliert (Abb. 38 B).



Abb. 38: Vergleich der Zellkulturmodell-abhängigen Genexpression in uninfizierten NHEK-Präparaten unterschiedlicher Transkriptomanalysen. Um kultivierungszeitunabhängig differentiell exprimierte Gene zwischen uninfizierten 3D- und 2D-kultivierten NHEK zu identifizieren, wurden aus beiden Transkriptomanalysen sowohl alle höher (A) als auch alle weniger stark exprimierten (B) Gene mit dem Venny-Tool 2.1 (BioinfoGP) miteinander verglichen. Die in beiden Analysen höher exprimierten Gene wurden zusätzlich mittels BiNGO-Tool (Cytoscape) auf regulierte biologische Prozesse analysiert (C). Der p-Wert und somit die Signifikanz der Cluster ermitteln sich wie in Abb. 31 und in den Methoden (2.18.4) beschrieben. Aufgeführt sind ausgewählte, relevante GO-Terms und jeweilige Beispielgene. KO: Kontrolle.

Für die Identifikation von Genen, die in den jeweiligen Zellkulturmodellen unabhängig von der initialen Viruslast und des analysierten Zeitpunktes immer durch eine CPXV Infektion hochreguliert werden, wurden die entsprechenden Genlisten aus den beiden Transkriptomläufen (siehe 3.4.1 und 3.4.2) mittels Venny-Software miteinander verglichen. Im 3D-Infektionsmodell ergaben sich daraus 14 (2,8 %) gemeinsam hochregulierte Gene (Abb. 39 A), die laut GO-Term Analyse hauptsächlich auf die positive Regulation der Biosynthese, die Einfluss Signaltransduktion sowie Proteinphosphorylierung und die Zellantwort auf organische Substanzen haben (Abb. 39 C). Eine Infektion im Monolayer führte in jedem der Infektionssetups zu einer Hochregulation von 27 (2,1 %) gemeinsamen Transkripten (Abb. 39 B). Durch diese Gene signifikant hochregulierte biologische Prozesse waren neben der Bewegung zellulärer Komponenten und der Systementwicklung auch direkt mit der Infektion assoziierte Vorgänge wie die Antwort auf einen externen Stimulus, die Stressantwort und die negative Regulation der viralen Reproduktion. Zudem waren Gene zur Regulation der Apoptose und der Genexpression signifikant überrepräsentiert (Abb. 39 D).



Hochregulierte Gene

Abb. 39: Vergleich der CPXV-induzierten differentiellen Genexpression von NHEK in den verschiedenen Zellkulturmodellen bei unterschiedlichen Infektionssetups. Um unabhängig vom Infektionssetup (MOI, Kultivierungsdauer) CPXV-induzierte differentiell exprimierte Wirtszellgene Zellkulturmodell-intern in 3D- und 2D-kultivierten NHEK zu identifizieren, wurden aus beiden Transkriptomanalysen alle hochregulierten Gene der verschiedenen Infektionssetups mit dem Venny-Tool 2.1 (BioinfoGP) miteinander verglichen. Alle gemeinsam regulierten Gene aus der 3D-Kultivierung (A) bzw. aus der Monolayer-Kultivierung (B) wurden zusätzlich mittels BiNGO-Tool (Cytoscape) auf regulierte biologische Prozesse analysiert (C + D). Der p-Wert und somit die Signifikanz der Cluster ermitteln sich wie in Abb. 31 und in den Methoden (2.18.4) beschrieben. Aufgeführt sind ausgewählte, relevante GO-Terms und jeweilige Beispielgene. KO: Kontrolle.

Von den Transkripten, die in jedem 3D-Infektionssetup hochreguliert waren, war die Hälfte in keinem der Monolayer-Infektionsversuche differentiell reguliert. Dabei handelte es sich um die Gene *IL11, IL6, IL23A, SORBS1, AGAP11, ZDBF2* und *TSPYL2*. In allen Infektionssetups (3D + 2D) waren dagegen die Gene *NR4A1, TNFRSF10D, DNAJB4, SOCS3* und *DNAJA4* hochreguliert.

3.4.4. Übertragung der Transkriptomdaten auf weitere Infektionszeitpunkte und Zelltypen

Um den Verlauf der mRNA-Expression sechs ausgewählter Gene im Detail zu charakterisieren, die in beiden Transkriptomanalysen zwischen 3D- und Monolayer-Kultur signifikant reguliert waren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Präparate einer CPXV-Infektionskinetik (MOI = 0,01) beider Zellkulturmodelle über vier Tage mittels qPCR analysiert (Abb. 40). Der Vergleich der uninfizierten Proben zeigte eine über die gesamte Kultivierungszeit höhere Expression der Gene *CASP14, CALML5, RNASE7* und *IL1R2* in der 3D-Kultur. Die Expression der Gene *MAT2A* und *HSPA1B* war im Gegensatz dazu entgegengesetzt zeitabhängig. Während *MAT2A* mit fortschreitender Kultivierungszeit in der 3D-Kultur immer stärker exprimiert wurde (Abb. 40 D), fiel die differentielle Expression von *HSPA1B* im gleichen Zeitraum von einem ca. 11-fach erhöhten Ausgangsniveau sukzessiv ab, bis sie schließlich 96 h *p.i.* in beiden Modellen das gleiche Level erreichte (Abb. 40 E). Die zeitabhängige Analyse einer CPXV-Infektion in NHEK zeigte keinen Einfluss der Kultivierungsart auf die Gene *RNASE7, MAT2A* und *HSPA1B*.



Abb. 40: qPCR-Analyse der mRNA-Expression ausgewählter, differentiell regulierter Gene aus den Transkriptomanalysen von NHEK zu verschiedenen Zeitpunkten. Um den zeitlichen Verlauf der differentiellen Genexpression verschiedener regulierter Gene aus den Transkriptomanalysen analysieren zu können, wurden 3D- und Monolayer-kultivierte NHEK für 24, 48, 72 und 96 Stunden mit CPXV (MOI = 0,01) infiziert und die jeweiligen aufgereinigten mRNAs per qPCR analysiert (inklusive entsprechender Kontrollen). Es wurden jeweils sowohl die uninfizierten Kontrollen (KO) der beiden Zellkulturmodelle (grün) als auch die Zellkulturmodell-internen infizierten und uninfizierten Proben (3D: dunkelrot; 2D: hellrot) miteinander verglichen. Die Messungen erfolgten in biologischen Triplikaten.

Die relative Expression von *CASP14* und *CALML5* fiel in den infizierten 3D-Präparaten sukzessiv über die Kultivierungszeit bis auf < 10 % der Expression der jeweiligen Kontrollen 96 h *p.i.* (Abb. 40 A + B). Eine Steigerung der Genexpression im Vergleich zu den uninfizierten 3D-Präparaten konnte dagegen für *IL1R2* 48 und 72 h *p.i.* detektiert werden (Abb. 40 F). Für die Monolayer-Infektion konnte für die Gene *MAT2A, HSPA1B* und *IL1R2* eine starke Zeitabhängigkeit der mRNA-Expression festgestellt werden. Die relative Expression aller drei Gene stieg während der CPXV-Infektion im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollen sukzessiv bis zu einem Maximum 96 h *p.i.* von jeweils mehr als den Faktor 10 an. Die Expression der Gene *CASP14, CALML5* und *RNASE7* war im Gegensatz dazu in den Monolayer-Kulturen über den gesamten Zeitraum nur wenig reguliert.

Auf Proteinebene konnte mittels Western Blot eine Zellkulturmodell-abhängige Expression von RNASE7 nachgewiesen werden, welches ausschließlich in der 3D-Kultur detektierbar war (Abb. 41). Mit fortschreitender Infektion war zudem in der 3D-Kultur eine Abnahme der Signalintensität zu detektieren, die 96 h *p.i.* ihr Minimum erreichte. Die Proteinexpression von CASP14 in 3D-Kultur konnte im Gegensatz zur uninfizierten Kontrolle 24 h *p.i.* nur in geringen Mengen nachgewiesen werden und wies 48 h *p.i.* die maximale Intensität auf. An den folgenden Zeitpunkten fiel die Expression stark ab, bis sie 96 h *p.i.* nicht mehr nachweisbar war. Im Kontrast dazu, konnte in der Monolayer-Infektionskinetik eine sukzessive Steigerung der CASP14 Expression detektiert werden, die ihr Maximum 96 h *p.i.* erreichte.



Abb. 41: Analyse der Proteinexpression ausgewählter, differentiell regulierter Gene aus der Transkriptomanalyse von NHEK zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurden jeweils 10 µg der Proteinlysate von 3D- und 2D-kultivierten NHEK, die für 24, 48, 72 und 96 Stunden mit CPXV infiziert wurden (MOI = 0,01) mittels Western Blot auf die zellulären Proteine RNASE7 und CASP14, sowie auf das virale Oberflächenprotein CPXV168 (A33) untersucht. Zur Normierung diente das zelluläre Referenzprotein Beta-Actin (ACTB). Als Kontrolle (KO) diente jeweils ein uninfiziertes Präparat, das 96 Stunden nach Beginn des Infektionsversuches entnommen wurde.

Um Gene zu identifizieren, deren Expression möglicherweise unabhängig vom Zelltyp nur durch die Art der Kultivierung beeinflusst ist, wurden Genexpressionsanalysen von 3D- und Monolayerkultivierten Vero E6-Zellen mittels qPCR durchgeführt. Analysiert wurden zehn Gene, die in den Transkriptomanalysen von NHEK signifikante Unterschiede zwischen den Kultivierungsmodellen aufwiesen (Abb. 32).

Der Vergleich der uninfizierten Vero E6 3D- und 2D-Präparate ergab uneinheitliche Tendenzen für die verschiedenen Gene (Abb. 42 A). Während CASP14 und DSC1 in Vero E6 gar nicht nachgewiesen werden konnten, war eine mRNA Expression von CALML5 und RNASE7 nur im 3D-Modell zu detektieren. DGCR8 und HSPA1B waren in 3D-kultivierten Vero E6-Zellen deutlich höher exprimiert als im korrespondierenden Monolayer, in den NHEK-Kulturen jedoch nicht differentiell exprimiert. zeigten im Vergleich der uninfizierten Präparate der beiden Alle weiteren Gene Kultivierungsvarianten die gleichen Tendenzen wie bei NHEK. Der Vergleich von 3D- und 2Dkultivierten infizierten Vero E6-Kulturen 4 h p.i. (MOI = 5) ergab für sechs der zehn getesteten Gene keine differentielle Expression, was für fünf dieser Gene übereinstimmend mit den NHEK-Kulturen war (Abb. 42 B). Die Genexpression der restlichen vier Gene CASP14, CALML5, RNASE7 und DSC1 war in diesem Setup nur in den 3D-Kulturen zu detektieren und hatte somit übereinstimmend mit den NHEK-Resultaten ein höheres Level als im Monolayer. Die Analyse infizierter Kulturen 8 h p.i. (MOI = 5) ergab für die 3D-Kulturen eine, im Gegensatz zu den NHEK, geringere Expression der Gene MIR22HG, HSPA1B und IL1R2 im Vergleich zum Monolayer (Abb. 42 C). Die Expression von DDIT3, MAT2A und DGCR8 war ähnlich wie bei den NHEK-Kulturen durch die Kultivierungsart unbeeinflusst. Wie schon in den uninfizierten Kontrollen war auch 8 h p.i. die Expression von CASP14 und DSC1 in keinem der Modelle nachweisbar und die Expression von CALML5 und RNASE7 nur im 3D-Modell zu detektieren.

	/	4	[3	С		
	3D KO vs 2D KO		3D CPXV vs 2D C	PXV (4 h, MOI = 5)	3D CPXV vs 2D CPXV (8 h, MOI = 5)		
	FC qPCR (VERO)	FC NGS (NHEK)	FC qPCR (VERO)	FC NGS (NHEK)	FC qPCR (VERO)	FC NGS (NHEK)	
CASP14	-	25.2	hoch	26.0	-	7.7	
CALML5	hoch	10.4	hoch	14.5	hoch	5.2	
RNASE7	hoch	11.2	hoch	7.9	hoch	11.2	
DSC1	-	12.8	hoch	12.2	-	5.5	
DDIT3	3.7	4.9	1.0	1.1	0.8	1.3	
MAT2A	1.9	0.9	1.2	1.4	0.8	1.0	
MIR22HG	1.3	1.3	0.6	1.0	0.1	0.9	
DGCR8	5.3	1.3	0.9	1.0	0.7	0.7	
HSPA1B	4.2	1.0	0.8	1.1	0.4	1.1	
IL1R2	2.7	7.0	0.8	7.6	0.2	11.1	
			Tendenz zu	NGS stimmt]		
			Tendenz zi	u NGS falsch			
			Keine Expressi	on in 3D und 2D			

Abb. 42: qPCR-Analyse der Expression ausgewählter, in NHEK differentiell regulierter Targets in CPXV-infizierten (MOI = 5) und nicht-infizierten Vero-E6 Zellen. Für die Identifikation 3D-kultivierungsspezifischer und Zelltyp-unabhängiger Expressionsmuster verschiedener Gene wurden 3D- und Monolayer-kultivierte Vero-E6 Zellen mit CPXV (MOI = 5) infiziert und nach 4 bzw. 8 Stunden aufgereinigte mRNAs per qPCR analysiert (inklusive entsprechender Kontrollen). Die ermittelten *Fold Changes* (FC) der mRNA-Expression verschiedener Gene der jeweiligen uninfizierten Kontrollen (KO) (A) sowie der infizierten Präparate 4 h *p.i.* (B) und 8 h *p.i.* (C) wurden den korrespondierenden FCs aus der Transkriptomanalyse der NHEK-Kulturen gegenübergestellt und nach Tendenz der Übereinstimmung farblich kodiert. Der FC "hoch" zeigt an, dass nur in der 3D-Kultur eine Expression detektiert werden konnte.

85

3.5. Antivirale Therapie mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib

In der vergleichenden Transkriptomanalyse CPXV-infizierter 3D- und Monolayer-kultivierter NHEK, die mit einer geringen initialen MOI von 0,01 infiziert wurden, stellte sich heraus, dass 48 h p.i. die Genexpression des Kuhpocken Wachstumsfaktors (CGF), dem viralen Analogon des humanen epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), in 3D-Kulturen signifikant hochreguliert war. In einer vorigen Studie konnte von uns gezeigt werden, dass die Inhibition der CGF-induzierten Phosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch den Antitumorwirkstoff Gefitinib eine signifikante Reduktion der Virusreplikation und -weitergabe von Zelle zu Zelle in Monolayerkultivierten Zelllinien zur Folge hatte [87]. Um zu untersuchen, ob zum einen CGF eine ähnliche Rolle in primären humanen Keratinozyten spielt und ob darüber hinaus die Kultivierung der Zellen in 3D-Kultur die Funktion des CGF oder die Wirkungsweise des Gefitinib beeinflussen, wurden 3D- und Monolayer-kultivierte NHEK parallel mit CPXV mit einer MOI von 0,01 infiziert und mit verschiedenen Konzentrationen Gefitinib behandelt (siehe 2.20). Der verwendete Konzentrationsbereich umfasste die in der vorigen Studie bestimmte halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) des Gefitinibs gegen CPXV-Infektionen (4,93 µM). Da die Hochregulation des CGF in 3D-Kultur 48 h p.i. am eindeutigsten war, wurde zu diesem Zeitpunkt der Effekt der Wirkstoffgabe auf die Zellantwort und Virusreplikation und -verbreitung untersucht [200].

Dazu wurde das virale DNA-Genom sowie als Repräsentanten der Transkription früher und später viraler Gene die mRNAs für CGF (früh) und CPXV086 (spät) quantifiziert. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Kultivierungsmethoden bezüglich der Sensitivität gegenüber Gefitinib (Abb. 43 A – C). Während in Monolayer-Kultur erstmals eine signifikante Reduktion der viralen Genomreplikation (p < 0,01), der Expression des späten viralen Transkripts CPXV086 (p < 0,01) und der Expression des frühen viralen Transkripts CGF (p < 0,05) bei der höchsten Gefitinib Konzentration von 25 µM erzielt werden konnte, wurden in 3D-Kultur bereits bei 0,5 µM Gefitinib ähnliche inhibitorische Effekte erreicht (p < 0,01). Bereits bei einer Wirkstoff-Konzentration von 5 μ M konnten die viralen Nukleinsäuren im 3D-Modell um mehr als 98 % reduziert werden (p < 0,001). Die Genexpression des zellulären Proliferationsmarkers KI-67 korrelierte in beiden Zellkulturmodellen stark mit der Reduktion der viralen Nukleinsäuren und fiel somit durch eine Gefitinib-Behandlung bei deutlich geringeren Konzentrationen in 3D- als in Monolayer-Kultur ab (Abb. 43 D). Demgegenüber wurde eine Gefitinib-abhängige Reduktion der Zellviabilität in beiden Kultivierungsmodellen erst bei der höchsten Konzentration von 25 μ M beobachtet (Abb. 43 E). Während die IC₅₀ von Gefitinib in 3D-Kultur unter 0,5 μM lag, wurde analog zu unserer vorigen Studie [87] anhand der Plaquegrößenreduktion, die in Folge der Gefitinib-Behandlung im Monolayer erzielt werden konnte, eine IC₅₀ von Gefitinib für Monolayer-kultivierte NHEK von 6,3 μ M errechnet (Abb. 43 F).



Abb. 43: Einfluss der Gefitinib-Behandlung von CPXV-infizierten 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK auf die Virusreplikation und die zelluläre sowie virale Genexpression. NHEK wurden in beiden Zellkulturmodellen parallel mit CPXV infiziert (MOI = 0,01) und mit verschiedenen Konzentrationen Gefitinib behandelt (n = 3). Nach Beendigung des Versuchs 48 h *p.i.* wurde der Einfluss der antiviralen Behandlung auf die Virusreplikation (A), auf die virale (B + C) und die zelluläre (D) Genexpression sowie auf die Zellviabilität (E) analysiert. Die viralen GE wurden auf die Zellzahl, die mRNA-Werte auf die zellulären Referenzgene *MYC, GAPDH* und *TBP* normiert und in Relation zu den unbehandelten infizierten Proben (0 μ M) grafisch dargestellt. Zur Ermittlung der halbmaximalen inhibitorischen Hemmstoff-Konzentration (IC₅₀) wurde zudem die Plaquegrößenreduktion in Abhängigkeit der Gefitinib-Konzentration analysiert (F; n = 10).

Aufgrund der eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Kultivierungsmethoden bei Gefitinib-Konzentrationen von 5 μ M und 25 μ M, wurde der Effekt dieser beiden Konzentrationen auf die CPXV-Infektion von NHEK ausführlicher mittels IHC-Analysen von 3D-Kulturen und IFA-Analysen von Monolayer-Kulturen untersucht. Während die Expression des EGFR weder durch die CPXV-Infektion noch durch die Gefitinib-Gabe beeinflusst war (Abb. 44 A + 45 A), war die Phosphorylierung des EGFR nur nach Infektion der Zellkulturen nachzuweisen und korrelierte in beiden Kultivierungsmodellen mit der Virusverbreitung (Abb. 44 B + 45 B). In Monolayer-Kultur konnten auch bei einer Gefitinib Konzentration von 25 µM noch zahlreiche CPXV-induzierte Virusplaques bestehend aus infizierten Zellen und phosphoryliertem EGFR detektiert werden. In 3D-Kultur waren dagegen bereits bei einer Gefitinib Konzentration von 5 µM, korrelierend mit der starken Reduktion der viralen Nukleinsäuren, weder infizierte Zellen noch phosphorylierte EGFR zu detektieren. Die Expressionsanalyse von KI-67 auf IHC- und IFA-Ebene zeigte eine deutlich geringere Expression in uninfizierten und CPXV-infizierten 3D-Kulturen als in den korrespondierenden Monolayer-kultivierten NHEK (Abb. 44 C + 45 C). Im Gegensatz zur Analyse auf mRNA-Ebene konnte in Monolayer-Kultur bereits bei einer Konzentration von 5 μM eine Reduktion des KI-67 Signals detektiert werden, welche bei 25 μM nochmals stärker ausgeprägt war. In 3D-Kultur konnten dagegen bei beiden Konzentrationen keine KI-67 positiven Zellen detektiert werden.



Abb. 44: IFA-Analyse des Einflusses der Gefitinib-Behandlung von CPXV-infizierten Monolayer-kultivierten NHEK auf die Virusverbreitung und die zelluläre Antwort [200]. Unbehandelte (0 μ M) sowie Gefitinib-behandelte (5 μ M + 25 μ m) Monolayer-Präparate wurden 48 h *p.i.* fixiert. Es wurde die Expression und Lokalisation des unphosphorylierten (A) und phosphorylierten (B) epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und des Proliferationsmarkers KI-67 (C) mikroskopisch analysiert. Infizierte Bereiche sind durch die CPXV-kodierte GFP-Expression (grün) zu erkennen, die Zielproteine sind gelb markiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken: 100 μ m.



Abb. 45: IHC-Analyse des Einflusses der Gefitinib-Behandlung von CPXV-infizierten 3D-kultivierten NHEK auf die Virusverbreitung und die zelluläre Antwort [200]. Unbehandelte (0 μ M) sowie Gefitinib-behandelte (5 μ M + 25 μ m) 3D-Präparate wurden 48 h *p.i.* fixiert und für die IHC präpariert. Es wurde die Expression und Lokalisation des unphosphorylierten (A) und phosphorylierten (B) epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und des Proliferationsmarkers KI-67 (C) mikroskopisch analysiert. Infizierte Bereiche sind durch die CPXV-kodierte GFP-Expression (grün) zu erkennen, die Zielproteine sind gelb markiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Die weißen Boxen in den CPXV-Kontrollbildern sind Vergrößerungen von infizierten Bereichen. Maßstabsbalken: 100 µm.

3.6. Vergleich der 3D-Kultivierung mit alternativen Kultivierungsmethoden

Neben dem in dieser Arbeit etablierten 3D-Zellkulturmodell stehen eine Reihe anderer Kultivierungsmethoden mit teils höherer oder geringerer Komplexität als der des Perikard-Modells zur Verfügung, die ebenfalls für die Charakterisierung von Virusinfektionen geeignet wären. Exemplarisch für ein komplexeres 3D-Modell wurden daher vergleichende Analysen mit einem aus primären, humanen Keratinozyten und Fibroblasten bestehenden *in vitro* Hautmodell angestellt, das im Rahmen der Promotion von Herrn Markus Neumann am Robert Koch-Institut für die Charakterisierung von CPXV-Infektionen etabliert wurde [201]. Als weniger komplexe Alternativmethode, die von der Handhabung ähnlich der konventionellen Monolayer-Kultivierung ist, wurden NHEK auf Kollagen I-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert und mit CPXV infiziert. Kollagen I ist Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (EZM) und bietet sich somit für Vergleiche mit dem in dieser Studie etablierten EZM-basierten 3D-Zellkulturmodell an.

3.6.1. Vergleich mit komplexeren 3D-Modellen: Raft-Kulturen der Haut

Für vergleichende Transkriptomanalysen 3D-kultivierter NHEK (EZM-Modell; im Folgenden 3D-Kultur) mit NHEK, die in einem *in vitro* generierten Hautmodell kultiviert wurden, wurden Präparate beider Modelle nach den jeweils etablierten Protokollen präpariert. NHEK wurden sieben Tage lang in 3D-Kultur vorkultiviert, anschließend mit CPXV mit einer MOI von 0,01 infiziert und 48 h *p.i.* aus der Kultur genommen (n = 3). Die Ergebnisse zu den Hautäquivalenten wurden von Markus Neumann generiert und zu Vergleichszwecken zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde nach der Vorkultivierung der Äquivalente bis zu einem ausreichenden Differenzierungsgrad die obere Schicht der Epidermis (Hornschicht) mit CPXV infiziert. 18 h *p.i.* wurde die Epidermis von der Dermis getrennt und für die Transkriptomanalyse präpariert (n = 3). Von beiden Zellkulturmodellen wurden zudem uninfizierte Präparate nach dem jeweils gleichen Kultivierungsprotokoll angefertigt (n = 3), sodass insgesamt 12 Präparate für das NGS verwendet wurden.

Die Transkriptomanalyse ergab beim Vergleich der infizierten Präparate aus beiden 3D-Modellen eine signifikant höhere Expression von 42 (18,3 %) und eine signifikant niedrigere Expression von 33 (14,4 %) viralen Genen in 3D-Kultur gegenüber dem Hautmodell (Abb. 46 A). Bei 79 % (33 von 42) der hochregulierten Gene handelte es sich um intermediär oder spät exprimierte Transkripte, 76 % (25 von 33) der weniger stark exprimierten Gene waren dagegen frühe Genprodukte (siehe Appendix, Abb. A 2). Die statistische Auswertung aller humanen Gene mit > 100 Reads ergab, dass in der infizierten 3D- gegenüber der korrespondierenden Haut-Kultur ca. 9,6 % aller Transkripte höher und 4,4 % weniger stark exprimiert waren (Abb. 46 A).

90

Durch einen Abgleich mit der Analyse der differentiellen Genexpression von nicht infizierten 3D- und Haut-Präparaten konnte gezeigt werden, dass 27 % dieser höher und 31 % dieser weniger stark exprimierten Gene ausschließlich der Infektion und nicht bereits der unterschiedlichen Kultivierungsmethode zuzuordnen waren. Die Zellkulturmodell-internen differentiellen Genexpressionsanalysen ergaben, dass im Hautmodell durch die CPXV Infektion 2,4 % aller humanen Gene signifikant hoch- und 0,5 % herunterreguliert wurden, in 3D-Kultur dagegen nur ca. 0,2 % bzw. 0,04 % (Abb. 46 B). Allein durch die Kultivierung der NHEK in unterschiedlichen 3D-Zellkulturmodellen waren 17 % aller Gene in 3D-Kultur höher und 5,5 % weniger stark exprimiert als im Hautmodell (3D KO vs. Haut KO).



Abb. 46: Transkriptom- und GO-Term-Analyse von CPXV-infizierten und uninfizierten 3D-kultivierten NHEK und korrespondierender *in vitro* generierter Haut. Für die Gegenüberstellung der differentiellen Genexpression 3D-kultivierter NHEK (MOI = 0,01; 48 h *p.i.*), *in vitro* generierter Haut (hohe MOI; 18 h *p.i.*) und der jeweiligen Kontrollen (KO) wurden nach einer Transkriptomanalyse mittels HiSeq-Plattform (Illumina) für verschiedene Vergleichsebenen alle hoch- bzw. herunterregulierten Gene mit einem korrigierten p-Wert (FDR: *false discovery rate*) von < 0,05, einer Readzahl von > 100 und einem FC von > |2|extrahiert. Es sind die statistischen Auswertungen sowohl für den Vergleich der infizierten Proben (A) als auch für alle weiteren möglichen Vergleiche innerhalb des Laufs (inklusive der jeweiligen uninfizierten Kontrollen) (B) in Tabellen aufgeführt. Zudem wurden mittels BiNGO-Tool (Cytoscape) regulierte Gene ausgewählter Vergleiche in sogenannte GO-Terms eingruppiert (C + D + E). Der p-Wert und somit die Signifikanz eines so ermittelten regulierten biologischen Prozesses ermitteln sich wie in Abb. 31 und in den Methoden (2.18.4) beschrieben. Alle Messungen erfolgten in biologischen Triplikaten.

Die GO-Term Analyse der Gene, die im direkten Vergleich der infizierten Präparate nur während der Infektion im 3D-Modell höher exprimiert waren als im Hautmodell, ergab eine signifikante Überrepräsentation von Genen, die Einfluss auf die Antwort auf chemische Stimuli, auf metabolische Prozesse und auf eine negative Regulation der Apoptose haben (Abb. 46 E).

Beim Vergleich der uninfizierten Modelle waren in 3D-Kultur Gene höher exprimiert, die der Mitose, der zellulären Stressantwort, der Zytoskelett-Organisation und der Hemidesmosomen-Bildung zugeordnet sind (Abb. 46 C). In diesem Vergleich in 3D-Kultur herunterregulierte Gene hatten ebenfalls Einfluss auf die zelluläre Stressantwort. Weiterhin negativ reguliert waren zudem die biologischen Prozesse der Epidermis Entwicklung und Differenzierung, der Wundheilung und der zellulären Antwort auf biotische Stimuli (Abb. 46 D).



Abb. 47: Vergleich der am stärksten differentiell exprimierten Gene in Perikard- und Monolayer-kultivierten NHEK und in *in vitro* generierter Haut während der CPXV-Infektion. Um Gemeinsamkeiten der Genexpressionsänderung in Folge einer CPXV-Infektion in den unterschiedlichen Zellkulturmodellen zu analysieren, wurden aus den vergleichenden Transkriptomanalysen die jeweils 30 am stärksten signifikant hoch – bzw. herunterregulierten Gene aus jedem der vier aufgeführten Vergleiche inklusive der dazugehörigen *Fold Changes* (FC) extrahiert und den korrespondierenden FCs aus den jeweils anderen drei Vergleichen gegenübergestellt. Duplikate wurden entfernt, die FCs zur Basis 2 logarithmiert und die resultierende Matrix bestehend aus 212 Genen mittels R-basierter Software (CIMminer) auf gemeinsame Gencluster analysiert. In der Vertikalen wurden die Gene und auf der Horizontalen die Zellkulturmodelle nach größter gemeinsamer Genexpression zusammengefasst. Durch die Infektion herunterregulierte Gene sind grün, hochregulierte Gene rot und unregulierte Gene schwarz dargestellt (siehe Legende). KO: Kontrolle. Um zu analysieren, welche der drei verwendeten Zellkulturmodelle (3D, Monolayer, Haut) im Infektionskontext die größten Gemeinsamkeiten aufwiesen, wurden für jedes Modell die Expressionen der 30 am stärksten durch eine CPXV-Infektion hoch- und herunterregulierten humanen Gene extrahiert und mit den korrespondierenden Genexpressionen der jeweils anderen Modelle verglichen.

Eine Gruppierung der Gene, deren Expressionsmuster am ähnlichsten waren und eine anschließende Gruppierung der Zellkulturmodelle, deren Gesamtexpressionsmuster für alle untersuchten Gene die größte Ähnlichkeit besaßen, ergab für das Perikard-basierte 3D-Modell im Vergleich zu den betrachteten Monolayer-Ansätzen die geringste euklidische Distanz zum komplexen *in vitro* Hautmodell (Abb. 47). Die infektionsinduzierte differentielle Genexpression im Hautmodell konnte somit am ehesten von der Perikard-basierten 3D-Kultur nachgebildet werden. Die größten Ähnlichkeiten zueinander insgesamt zeigten dagegen die beiden unterschiedlichen Monolayer-Infektionen und die Perikard- und Monolayer-Kulturen, die jeweils mit einer niedrigen MOI infiziert waren.

3.6.2. Vergleich mit weniger komplexen Zellkulturmethoden: Kollagen I-Beschichtung

Um die Virusreplikation und -reifung in Zelllinien zu charakterisieren, die auf Kollagen I-beschichteten Zellkulturplatten (im Folgenden: Kollagen I-Kulturen) kultiviert wurden, wurden Vero E6-Zellen mit CPXV mit einer MOI von 0,01 infiziert und nach 24, 48, 72 und 96 h p.i. auf virale Nukleinsäuren und PFU getestet. Für den Vergleich mit anderen Kultivierungsbedingungen wurden analog analysierte Präparate aus 3D- und Monolayer-Kultur hinzugezogen. Die Synthese viraler Genomäquivalente stieg in Kollagen I-Kulturen über den Kultivierungszeitraum bis 72 h p.i. und stagnierte auf dem erreichten Level weitere 24 h (Abb. 48 A). Ähnlich waren auch die Verläufe für intrazellulär detektierte virale mRNA (Abb. 48 B) und infektiöse Einheiten (PFU) pro Zelle im Überstand (Abb. 48 C). Während die Level dieser drei analysierten Virusparameter fast zu jedem Zeitpunkt über denen der 3D-Kultur lagen, wurden in Monolayer-Kultur über den gesamten Infektionszeitraum sogar mehr intrazelluläre virale GE und PFU im Überstand detektiert als in der Kollagen I-Kultur. Virale Transkripte wurden dagegen vor allem zu den späten Infektionszeitpunkten auf höchstem Level in Kollagen I-Kulturen synthetisiert. Der Quotient der PFU zu viralen GE, der beschreibt, welcher Anteil der gebildeten Viruspartikel tatsächlich infektiös ist, befand sich in Kollagen I-Kulturen an den ersten beiden Tagen nach Infektion auf einer Höhe mit den Monolayer-kultivierten Vero E6-Zellen und glich sich 72 und 96 h p.i. den Quotienten der 3D-Kulturen an, die über den gesamten Kultivierungszeitraum einen höheren Anteil infektiöser Partikel zur Gesamtmenge an freigesetzten Viruspartikeln zeigten als Monolayer-kultivierte Zellen (Abb. 48 D).



Abb. 48: Analyse von CPXV-Infektionskinetiken in 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten Vero E6-Zellen auf infektiöse Einheiten (PFU) und auf Nukleinsäureebene. Um die Virus-Replikation und -Reifung bei einer CPXV Infektion mit einer MOI von 0,01 zwischen den drei Zellkulturmodellen in Vero E6-Zellen vergleichen zu können, wurden zu jeweils vier Zeitpunkten die intrazellulären CPXV-GE (A) und viralen mRNAs des späten *CPXV086 (17L)*-Gens (B) per qPCR analysiert und die jeweiligen PFU in den Zellkulturüberständen per Plaque-Assay bestimmt (C). Eine Normierung erfolgte auf Nukleinsäureebene auf das Referenzgen MYC und für die PFU-Bestimmung auf die mittlere Zellzahl. Weiterhin wurden die PFU als Maß für die Effektivität der Virusreifung jeweils auf die über qPCR ermittelten viralen Genomäquivalente (GE) normiert (D). Alle Messungen erfolgten in biologischen Duplikaten.

Die Zellviabilität Kollagen I-kultivierter infizierter Vero E6-Zellen war wie bei den anderen Kultivierungsmodellen bis 72 h *p.i.* auf einem annähernd unverändertem Niveau im Vergleich zu den jeweiligen uninfizierten Kontrollen (Abb. 49). 96 h *p.i.* fiel die Viabilität der Kollagen I-Zellen auf < 20 %, während im Monolayer kaum noch Restviabilität (< 2 %) vorhanden war und in 3D-Kultur weiterhin keine Veränderung des Zellstatus zu beobachten war. Nach 168 h waren sowohl in Kollagen I- als auch in Monolayer-Kultur keine viablen Zellen mehr zu detektieren. Die Viabilität der 3D-Kultur lag zu diesem Zeitpunkt bei > 50 %.

Analog zu den Analysen viraler Replikation und Reifung in Kollagen I-kultivierten Vero E6-Zellen wurden CPXV-Infektionen in NHEK untersucht und die drei Kultivierungsmethoden miteinander verglichen (Abb. 50). Mit Ausnahme des Zeitpunktes 72 h *p.i.*, an dem ein leichter Rückgang aller untersuchter Parameter für die Kollagen I-Kulturen zu verzeichnen war, stieg sowohl die Zahl intrazellulärer viraler GE und mRNA als auch die im Überstand detektierten PFU sukzessiv über den gesamten Kultivierungszeitraum an. Das Level intrazellulärer Nukleinsäuren (GE + mRNA) war dabei zu allen Zeitpunkten geringer, als in den korrespondierenden 3D- und Monolayer-Kulturen (Abb. 50 A + B).



Abb. 49: Analyse der Viabilität für CPXV-Infektionskinetiken in 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten Vero E6-Zellen. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde von CPXV-infizierten Präparaten (MOI = 0,01) die Zellviabilität ermittelt, auf die Viabilität der jeweiligen Kontrollen (KO) normiert und als relativer Wert angegeben. Die Messungen erfolgten in biologischen Duplikaten.

Infektiöse Einheiten wurden im Überstand während der ersten 72 h *p.i.* auf vergleichbarem Level mit den anderen Kultivierungsmodellen detektiert, allerdings stiegen die gebildeten PFU im Kollagen I-Modell im Gegensatz zu 3D- und Monolayer-Kultur auch 96 h *p.i.* weiter an und waren zu diesem Zeitpunkt um eine log-Stufe gegenüber den anderen Modellen erhöht (Abb. 50 C).



Abb. 50: Analyse von CPXV-Infektionskinetiken in 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten NHEK auf infektiöse Einheiten (PFU) und auf Nukleinsäureebene. Um die Virus-Replikation und -Reifung bei einer CPXV Infektion in NHEK mit einer MOI von 0,01 zwischen den drei Zellkulturmodellen vergleichen zu können, wurden zu jeweils vier Zeitpunkten die intrazellulären CPXV-GE (A) und viralen mRNAs des späten *CPXV086 (171)*-Gens (B) per qPCR analysiert und die jeweiligen PFU in den Zellkulturüberständen per Plaque-Assay bestimmt (C). Eine Normierung erfolgte auf Nukleinsäureebene auf das Referenzgen *MYC* und für die PFU-Bestimmung auf die mittlere Zellzahl. Weiterhin wurden die PFU als Maß für die Effektivität der Virusreifung jeweils auf die über qPCR ermittelten viralen Genomäquivalente (GE) normiert (D). Alle Messungen erfolgten in biologischen Duplikaten.

Der Quotient der PFU zu viralen GE war in Kollagen I-Kulturen über die gesamten 96 h nahezu konstant und auf dem gleichen Niveau wie in 3D-kultivierten NHEK, während der Quotient in Monolayer-Kultur zu allen Zeitpunkten um etwa eine log-Stufe geringer war (Abb. 50 D).

Um das Verhalten primärer humaner Zellen in den unterschiedlichen Zellkulturmodellen auf molekularer Ebene charakterisieren und vergleichen zu können, wurde die Expression neun differentiell regulierter Gene, die aus der ersten Transkriptomanalyse ausgewählt wurden (siehe 3.4.1) in uninfizierten und CPXV-infizierten 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten NHEK mittels qPCR analysiert (Abb. 51). Beim Vergleich der uninfizierten Präparate untereinander (KO vs. KO) waren nach einer kurzen Kultivierungszeit (zusätzlich zur jeweiligen Vorkultivierung) von 8 h große Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Kollagen I- und 3D-kultivierten NHEK detektierbar, während sich die Kollagen I- und 2D-Kulturen sehr ähnelten. Nach 48 h befand sich in allen uninfizierten Kulturen die Expression der untersuchten Gene bis auf wenige Ausnahmen in einem sehr unterschiedlichen Stadium.

		8 h, MOI = 5			Į.	48 h, MOI = 0,01				96 h, MOI = 0,01			
	Gen	3D vs. Koll	3D vs. 2D	Koll vs. 2D	i.	3D vs. Koll	3D vs. 2D	Koll vs. 2	D	3D vs. Koll	3D vs. 2D	Koll vs. 2D	
	CASP14	18.84	10.96	1.04		1.32	25.38	20.91		0.74	41.20	44.08	
	CALML5	14.80	5.68	0.69	į.	16.80	12.98	0.84		0.29	15.57	42.34	
Ô	RNASE7	22.17	11.04	0.89		41.31	15.98	0.42		8.77	20.63	1.87	
s.	DSC1	13.19	5.98	0.81		6.54	23.08	3.84		0.53	19.22	28.96	
>	MAT2A	1.17	0.20	0.31	į.	0.37	10.01	29.30		1.28	44.32	27.60	
$\overline{\mathbf{S}}$	MIR22HG	1.02	0.19	0.33		0.54	3.57	7.23		0.52	2.76	4.19	
	DGCR8	0.76	0.34	0.80	1	0.27	5.39	21.49		0.59	12.39	16.74	
	HSPA1B	0.33	0.11	0.59	i.	0.19	4.26	24.10		0.49	1.04	1.68	
	IL1R2	3.01	3.20	1.90		2.88	27.81	10.50		104.58	532.07	4.04	
				÷									
	Gen	Koll	3D	2D	ł.	Koll	3D	2D		Koll	3D	2D	
	CASP14	1.10	0.23	0.25		3.70	0.45	0.31		0.50	0.03	1.48	
0	CALML5	0.66	0.54	0.29		18.24	1.39	0.21	i	0.17	0.06	0.26	
ž	RNASE7	2.55	1.84	2.46		6.26	1.72	0.42		1.93	0.77	0.95	
VS,	DSC1	0.75	1.75	0.31		3.99	0.67	0.93		0.07	0.10	0.66	
2	MAT2A	0.72	0.34	0.17		0.84	1.27	0.22	i	0.79	1.21	14.28	
A	MIR22HG	2.24	0.80	0.94		2.35	1.35	0.13		0.17	0.66	0.48	
0	DGCR8	1.18	0.85	0.62		1.70	0.83	0.14	İ	0.31	1.19	1.16	
	HSPA1B	0.54	0.64	0.26		0.98	0.78	4.63		17.24	1.12	11.03	
	IL1R2	1.94	0.96	0.82		4.66	6.87	1.21		8.49	1.77	15.58	
	hochreguliert					herunterreguliert				unreguliert			

Abb. 51: qPCR-Analyse der Expression differentiell regulierter Gene aus der Transkriptomanalyse in 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten NHEK in verschiedenen Setups. Zum Zweck der Analyse Zellkulturmodell- und infektionsabhängiger Expression ausgewählter Gene, wurden qPCR-Analysen von CPXV-infizierten und nicht-infizierten (KO) 3D- und 2D-kultivierten NHEK (jeweils n = 3) und korrespondierenden Kollagen I-Kulturen (n = 2) durchgeführt. Die gemittelten Ct-Werte der Replikate wurden auf jeweils drei Referenzgene (*MYC, GAPDH, TBP*) normiert und abhängig vom betrachteten Vergleich wurde ein *Fold Change* (FC) zweier normierter Werte mittels ddct-Methode ermittelt. Es wurden sowohl Vergleiche von nicht-infizierten Kontrollen untereinander (KO vs. KO) als auch von infizierten Kulturen mit den jeweiligen Kontrollen (CPXV vs. KO) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion durchgeführt. Hochregulierte Gene (FC > 2) wurden rot, herunterregulierte Gene (FC < 0,5) grün und nicht oder sehr gering regulierte Gene weiß hinterlegt.

Nach 96 h war dagegen das Expressionsmuster im Kollagen I- und 3D-Modell sehr ähnlich und zeigte bis auf unterschiedliche Genexpressionen von *IL1R2* und *RNASE7* keine größeren differentiellen Regulationen von Genen. Im Vergleich zur Monolayer-Kultur war die Genexpression von sieben von neun untersuchten Genen bei Kollagen I-kultivierten NHEK zu diesem Zeitpunkt stark hochreguliert. Der Vergleich uninfizierter 3D- und Monolayer-Kulturen erbrachte über den gesamten Kultivierungszeitraum große Unterschiede in den Genexpressionsmustern.

Die infektionsinduzierte Expression der neun analysierten Gene zeigte im Kollagen I- und 3D-Modell bei einer hohen initialen CPXV-Viruslast nach 8 h ein ähnliches Muster, das sich von der Expression in Monolayer-Kultur teilweise deutlich unterschied (CPXV vs. KO). In beiden Kulturen waren nur jeweils zwei Gene durch die Infektion differentiell exprimiert, im Monolayer dagegen zwei Drittel aller Transkripte. Die Genexpressionsanalyse bei geringer initialer Viruslast 48 h *p.i.* zeigte große Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsmodellen. Während in 3D-Kultur weiterhin nur zwei Gene differentiell exprimiert waren, waren im Kollagen I-Modell sechs von neun Genen hoch- und in Monolayer-Kultur die gleiche Zahl von Genen herunterreguliert. Nach 96 h glich sich die Genexpressionsänderung zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen in Kollagen I- und Monolayer-kultivierten NHEK einander an, sodass nur noch wenige Gene unterschiedlich reguliert waren. In 3D-Kultur waren dagegen weiterhin nur wenige Gene durch die CPXV-Infektion differentiell exprimiert (3/9).

Um die Proteinexpression von Kollagen I-kultivierten NHEK mit der der anderen Zellkulturmodelle in uninfizierten und CPXV-infizierten Kulturen zu vergleichen, wurde mittels Western Blot die Expression des zwischen 3D- und Monolayer-Kultur differentiell exprimierten Proteins RNASE7 und des Proliferationsmarkers PCNA beispielhaft analysiert (Abb. 52). RNASE7 war in keinem der Kollagen I- und Monolayer-Präparate zu detektieren und wurde im Gegensatz dazu von allen analysierten 3D-Kulturen eindeutig exprimiert.



Abb. 52: Analyse der Expression ausgewählter, differentiell regulierter Proteine in CPXV-infizierten 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten NHEK zu verschiedenen Zeitpunkten (MOI=0,01). Zur Ermittlung der Zellkulturmodell-abhängigen Expressionsmuster auf Proteinebene in Folge einer Infektion wurden jeweils 10 µg der Proteinlysate der unterschiedlich kultivierten NHEK, die für 24, 48, 72 und 96 Stunden mit CPXV infiziert wurden (MOI = 0,01) mittels Western Blot auf die zellulären Proteine RNASE7 und den Proliferationsmarker PCNA, sowie auf das virale Oberflächenprotein A33 analysiert. Zur Normierung diente das zelluläre Referenzprotein Beta-Actin (ACTB). Als Kontrolle (KO) diente jeweils ein uninfiziertes Präparat, das 96 Stunden nach Beginn des Infektionsversuches entnommen wurde.

Während die Intensität von PCNA in Monolayer-Kultur von 48 h bis 96 h *p.i.* auf einem ähnlich hohen Niveau verblieb, war sowohl in 3D- als auch in Kollagen I-Kulturen ein deutlicher Abfall der Signalintensität mit fortschreitender CPXV-Infektion zu detektieren. Die geringste Expression von PCNA war in 3D-Kultur 96 h *p.i.* und in Kollagen I-kultivierten Zellen 72 h *p.i.* detektierbar.

Diskussion

4. Diskussion

4.1. Eignung der dezellularisierten extrazellulären Perikardmatrix als Fundament für 3D-Zellkulturen

Biologische dezellularisierte extrazelluläre Matrizes (EZM) wurden in der Literatur schon vielfach als Grundlage für die *in vitro* Gewebezüchtung (Tissue Engineering) und die Erforschung *in vivo*ähnlichen Verhaltens verschiedener Zelltypen beschrieben [127, 202, 203]. Neben den gewebeähnlichen strukturellen Besonderheiten der dezellularisierten Matrizes wie einer spezifischen Starrheit und Mikrostruktur, die die Morphologie und Anordnung der darauf kultivierten Zellen im hohen Maße beeinflussen, werden durch die EZM auch die Art bzw. Ausprägung der Zell-Zell- und vor allem Zell-Matrix-Interaktionen geprägt bzw. verstärkt [123, 204, 205]. Wiederum von diesen Interaktionen abhängig ist die Signalübertragung in die Zellen u. a. durch EZM-gebundene Wachstumsfaktoren, deren Verteilung, Aktivierung und Präsentation durch die EZM reguliert werden [206, 207].

Neben dezellularisierten EZMs stehen als nah verwandte Alternative u. a. auch nicht-dezellularisierte, mit Glutaraldehyd fixierte Gewebe gleichen Ursprungs für Zellkultivierungen zur Verfügung, die seit Jahrzehnten in der Gefäßchirurgie als Nahtmaterial eingesetzt werden und ähnlich wie ihre dezellularisierten Pendants rezellularisierbar sind [208]. Dem Vorteil der einfacheren Präparation und Bereitstellung solcher Matrizes stehen vor allem zwei Probleme gegenüber. Zum einen werden die ursprünglich auf der EZM angesiedelten Zellen lediglich fixiert und sind somit weiterhin vorhanden. Sie könnten also ungewollte Interaktionen mit später aufgebrachten Zellen bzw. Viren eingehen und somit die Analyse der späteren Besiedlung und Infektion auf molekularer oder bildgebender Ebene beeinträchtigen. Zum anderen können Glutaraldehyd-Reste in den Matrizes vorliegen, die Beeinträchtigungen des Zellwachstums durch zytotoxische Effekte zur Folge haben könnten [209].

Im Gegensatz zur Glutaraldehydfixierung werden durch eine Dezellularisierung mit Deoxycholsäure (DOA), die zur Generierung der in dieser Arbeit verwendeten Matrizes durchgeführt wurde, die Zellen und andere u. U. immunogene Komponenten vollständig von der Oberfläche und aus dem Inneren der EZM entfernt und das potentiell zellschädigende DOA sowie etwaige Endotoxine durch einen mehrstufigen Waschprozess aus der Matrix herausgespült [186]. Die Verträglichkeit der sogenannten resultierenden Matrix Patches[™] (Auto Tissue Berlin GmbH) als Nahtmaterial für Gefäße und deren erfolgreiche Neubesiedlung konnte bereits *in vivo* nachgewiesen werden [190]. In dieser Arbeit konnte neben der Zellfreiheit gezeigt werden, dass in der EZM keine Reste zellulärer RNA und eine Abreicherung von DNA, die zumeist im Inneren der EZM in Akkumulaten zu detektieren war, nachweisbar waren.

99

Diskussion

In der dezellularisierten EZM wurden minimale Reste des zellulären Strukturproteins ß-Actin, jedoch keine anderen Proteine, die Teil der durchgeführten Analysen waren, per Western Blot detektiert. Eine Bindungsneigung der dezellularisierten EZM für ATP, mRNA und DNA konnte nicht festgestellt werden. Zusammengefasst konnte somit das Risiko einer negativen Beeinflussung der Matrixrepopulation bzw. molekularer Analysen des Zellwachstums und nachfolgender Infektionen durch Dezellularisierungsrückstände als gering eingeschätzt werden.

Von der Dezellularisierung kaum beeinflusst war die Struktur und Ausrichtung der Kollagenfasern, die den Hauptbestandteil der EZM ausmachen. Die Beibehaltung dieser *in vivo*-ähnlichen Matrixintegrität ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal gegenüber der bloßen Bereitstellung der Matrix-Komponenten beim Überschichten von Zellkulturplatten oder in Form von Gelmatrizes als alternative 3D-Zellkulturansätze und kann erheblichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen haben [207, 210]. Zudem konnte für vergleichbare Präparationsverfahren zum Erhalt zellfreier EZMs gezeigt werden, dass trotz Dezellularisierung biologisch aktive Komponenten wie Zytokine oder Wachstumsfaktoren, die von ursprünglich im Perikard beherbergten Zellen *in vivo* synthetisiert und sekretiert wurden, in der EZM stabil gebunden bleiben [125]. Monokulturen von Epithelzellen können somit zum Beispiel durch die Präsenz zurückbleibender Proteine der *in vivo*-korrespondierenden Fibroblasten in physiologischer, Co-Kultur-ähnlicher Weise ergänzt werden, indem, dadurch vermittelt, u. a. gewebsspezifische Entwicklungsprozesse wie Zelldifferenzierung und -teilung verändert werden [211].

Des Weiteren konnten in dieser Arbeit die Basallamina-Hauptkomponenten Kollagen IV, Laminin und Fibronectin auf den Oberflächen der dezellularisierten Matrizes nachgewiesen werden. Diese werden *in vivo* durch Epithelzellen synthetisiert und lagern sich zur Basallamina zusammen, die, als Basis der Epithelzellen, neben einer bloßen Abgrenzungsfunktion zum Bindegewebe auch Einfluss auf den Stoffwechsel, die Polarität und die Differenzierung der Zellen hat [212]. Die Neubesiedlung der EZMs mit verschiedenen Zelltypen war jedoch im weiteren Verlauf dieser Arbeit bezüglich der Parameter Zellmorphologie, Zellzahl und Zellviabilität unbeeinflusst von der Seite der Matrix, die den Zellen für das Wachstum angeboten wurde. Ein etwaiger Einfluss der Basallamina auf das Wachstum der Zellen bestand somit lediglich auf molekularer Ebene und wurde in dieser Studie nicht weiter analysiert.

Zusammengefasst war die verwendete dezellularisierte perikardiale EZM, auf der *in vivo* neben eingebetteten Fibroblasten vor allem Epithelzellen angesiedelt sind, aufgrund ihrer strukturellen und molekularen Eigenschaften sehr gut für die Generierung von 3D-Zellkulturmodellen geeignet [185]. Vor allem Rezellularisierungen mit Epithelzellen waren wegen des natürlichen Vorkommens dieses Zelltyps im Ursprungsgewebe der EZM von besonderer biologischer Relevanz.

100
4.2. Einfluss der Kultivierungsmethode auf das Wachstum von Zellen

Die Verwendung verschiedener 3D-Zellkulturmodelle in unterschiedlichen Bereichen der Forschung nimmt mit fortschreitender Entwicklung dieser Modelle immer weiter zu [101]. Einer unter vielen Gründen für diesen Anstieg ist die Erkenntnis, dass das im Vergleich zu konventionellen Monolayer-Kulturen physiologischere Wachstum der Zellen in 3D-Kulturen in Folge verschiedener Stimuli direkten Einfluss auf das Verhalten der Zellen hat [91]. Daraus abgeleitete Erkenntnisse können zwischen den Kultivierungsmethoden stark variieren und somit die weiterführende Forschung in Bezug auf die Planung komplexerer (*in vivo*-) Versuche unter Umständen langfristig beeinflussen. Mit einer vom Indikationsbereich abhängigen Rate von 80 bis 95 %, mit der präklinisch erforschte Wirkstoffe in der klinischen Forschung scheitern, scheinen konventionelle Monolayer-Kultivierungen als Screening-Methode wenig geeignet zu sein [96]. Durch Verwendung von 3D-Zellkulturen in der Onkologie konnten diese Raten bereits zum Teil deutlich gesenkt werden [91].

Ein entscheidender Grund, warum sich Monolayer-Kultivierungen vor allem in der Virologie dennoch weiterhin so großer Beliebtheit erfreuen, sind die einfache Handhabung und hohe Reproduzierbarkeit dieser Kulturen im Gegensatz zu den meist komplexen und inhomogeneren 3D-Systemen [112]. Wie auch in dieser Arbeit für primäre humane Keratinozyten (NHEK) analysiert, ist die Variabilität bezüglich Parametern wie durchschnittlicher Zellzahl, Viabilität oder Genexpressionsverhalten zwischen Einzelpräparaten in 3D-Kultur höher als im Monolayer. Jedoch ist diese Variabilität mit steigender Komplexität von Organismen ebenfalls steigend und ist somit stellvertretend für *in vivo* Versuche. In 3D-Kulturen wird durch die Kultivierung selbst also eine *in vivo*-ähnliche Variabilität mit einkalkuliert, welche mit Hinblick auf die Prädiktion des *in vivo* Geschehens und somit auch für die klinische Forschung nicht nur als nachteilig angesehen werden muss.

Die komplexere Handhabung der 3D-Zellkultursysteme ist dagegen ein großes Problem, da somit der Arbeitsaufwand im Labor steigt, eine größere Expertise bezüglich der Zellkultivierung notwendig ist und so die Zahl potentieller Anwender eingeschränkt wird. Zudem ist aufgrund der hohen Komplexität die Anzahl verfügbarer 3D-Präparate für Einzelexperimente in der Regel relativ gering. Zusammen mit der angesprochenen höheren Variabilität der Kulturen sind Aussagen über die Signifikanz von erhaltenen Ergebnissen somit schwerer als in Monolayer-Kulturen zu treffen.

Das in dieser Arbeit etablierte 3D-Zellkulturmodell stellt im Kontrast zu komplexeren 3D-Ansätzen ein stark vereinfachtes, nutzerfreundliches System dar, das weniger spezifische Expertise verlangt und somit leichter erlernt werden kann. Für die Generierung der Präparate sind keine Co-Kultivierungen verschiedener Zelltypen notwendig und die Vorkultivierungszeit bis zum Erhalt von für Versuche verwendbaren Kulturen ist im Vergleich zu vielen anderen 3D-Ansätzen, wie zum Beispiel Raft-Kulturen der Haut, deutlich reduziert [130, 213].

Da equines Perikard routinemäßig in Schlachtbetrieben als Nebenprodukt anfällt und durch ein einfaches Dezellularisierungsverfahren in wiederbesiedelbare Matrix-Patches[™] umgewandelt werden kann [186, 187], stellt auch die Verfügbarkeit und somit die repräsentative Datenerhebung in Einzelexperimenten kein Problem dar. Nicht zuletzt ist das hier etablierte 3D-Zellkulturmodell an verschiedene Zelltypen und als Konsequenz für die Erforschung unterschiedlicher Viren adaptierbar, was es von spezifischen, hoch optimierten 3D-Zellkulturmodellen abhebt und einmal mehr für einen breiteren Anwenderkreis qualifiziert.

Trotz der relativen Einfachheit des in dieser Arbeit etablierten 3D-Zellkulturmodells weist es spezifische 3D-typische Eigenschaften und Veränderungen gegenüber konventionellen Monolayer-Kulturen auf, die auf den folgenden Seiten ausführlicher diskutiert werden.

4.2.1. Zellmorphologie

Eines der offensichtlichsten Unterscheidungskriterien zwischen 3D- und Monolayer-Kulturen ist die Zellmorphologie. Während Zellen, die auf Plastikoberflächen kultiviert werden, eine ausgebreitete und in der Höhe reduzierte Form annehmen, verhalten sich Zellen in 3D-Kultur in der Regel gewebstypisch und wachsen in einer runden bis kubischen Form [91, 214]. Durch diese kompaktere Morphologie ist in 3D-Kultur die Grundfläche von Einzelzellen im Vergleich zu Monolayer-kultivierten Zellen um ein Vielfaches reduziert und die Fläche, mit der sie an benachbarte Zellen oder die EZM angrenzen, stark erhöht [103].

Die in dieser Arbeit verwendeten Epithelzellen Vero E6 (permanente Zelllinie) und NHEK (humane Primärzellen) wuchsen auf der EZM in einer für 3D-Kulturen typische Weise. Sie besaßen eine kubische Morphologie und waren in alle räumlichen Dimensionen gleichmäßig ausgebreitet. Im Vergleich zu korrespondierenden Monolayer-Kulturen war die Grundfläche der NHEK um das vierfache und der Vero E6-Zellen um das acht- bis zehn-fache reduziert, wodurch dementsprechend mehr Zellen pro Fläche kultiviert werden konnten. Durch IHC-Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass die Zellkerne in 3D-Kulturen einen deutlich größeren Anteil an der betrachteten Grundfläche einnahmen, als in den korrespondierenden Monolayer-Kulturen und dass dementsprechend weniger zytoplasmatische Bereiche zu detektieren waren. Der Anteil des Zellkerns am Gesamtvolumen der Zelle ließ sich aufgrund der ungleichmäßigen Höhe der Zellen in Monolayer-Kultur nicht bestimmen. Während im Bereich des Nukleus eine Höhe von bis zu 10 µm ermittelt werden konnte, war diese in den zytoplamatischen Bereichen rund um den Zellkern teils um ein Vielfaches reduziert. Im Gegensatz dazu hatten die Zellen in 3D-Kultur über ihre gesamte Grundfläche eine gleichmäßige Höhe und die Zellkerne jenseits der mikroskopischen Fokusebene eine verminderte Breite, wodurch das Zytoplasma trotz vermindertem Anteil an der betrachteten Oberfläche mutmaßlich einen ähnlichen Anteil am Volumen der Zelle wie im Monolayer einnahm.

In Bezug auf nachfolgende Virusinfektionen waren, abgeleitet aus den diskutierten morphologischen Unterschieden, große Unterschiede zwischen Monolayer- und 3D-Zellkulturen zu erwarten. Dies galt sowohl für Primärinfektionen aufgrund der vergrößerten, zum Medium gerichteten Fläche pro Zelle in Monolayer-Kultur als auch für die Virusweitergabe von Zelle zu Nachbarzelle wegen der vergrößerten Kontaktflächen benachbarter Zellen in 3D-Kultur.

Bei der 3D-Kultivierung von Endothelzellen, Fibroblasten und vor allem der Keratinozyten-Zelllinie HaCat, die Haut-ähnliche Desmosomen ausbildete (Daten nicht ausgewiesen), waren ebenfalls starke morphologische Veränderungen im Vergleich zur Monolayer-Kultivierung zu beobachten, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht vertieft analysiert wurden.

Auf Kollagen I-beschichteten Zellkulturplatten wuchsen Epithelzellen trotz der Beschichtung mit einer der Hauptkomponenten der EZM weiterhin monolayerartig. Mögliche Gründe hierfür könnten unter anderem die wenig veränderte Starrheit des Zelluntergrunds gegenüber normalen Polystyrenplatten und die ungerichtete und somit unphysiologische Aufbringung der Kollagenfasern sein. Während in der Literatur, abhängig von der Ausrichtung der Kollagenfasern, zwar ein Einfluss auf die Zellsignalgebung, nicht aber auf die Zellmorphologie beschrieben wurde [210], konnte gezeigt werden, dass mit steigender Starrheit des Kultivierungsuntergrunds auch die Ausbreitungsfläche der kultivierten Zellen steigt [215].

Ein weiterer Schritt in Richtung Physiologie konnte zudem durch die aktive Induktion der terminalen Differenzierung primärer Keratinozyten in 3D-Kultur durch Kultivierung mit einem stark Calciumhaltigen Zellkulturmedium gemacht werden. Im Unterschied zum Standarddifferenzierungsverfahren von NHEK in Raft-Kulturen der Haut [216], wurden die Zellen zum einen nicht in einem Calciumarmen Kultivierungsmedium vorkultiviert und zum anderen über die gesamte Zeit submers gehalten. Dies trug zur leichteren Handhabbarkeit und zur Verkürzung der Vorkultivierungszeit im Vergleich zum komplexeren 3D-Modell bei. Die NHEK wuchsen auf der EZM im Gegensatz zur etablierten Standardkultivierung meist mehrschichtig und die oberen Zellschichten flachten im Vergleich zur basalen, proliferierenden Schicht merklich ab und verloren zum Teil ihre Nuklei. Dieses Differenzierungsverhalten ist typisch für humane Keratinozyten in vivo [217]. Trotz dieser erhöhten Ähnlichkeit zum modellierten Gewebe wurde diese Art der Kultivierung im weiteren Verlauf der Arbeit nicht für Infektionsversuche mit Kuhpockenviren verwendet, da die terminale Differenzierung einen großen Einfluss auf die Infizierbarkeit der Präparate gehabt hätte und nur in Verbindung mit einer Verletzung des Gewebes möglich gewesen wäre [169]. Für Viren wie das humane Papillomvirus (HPV) oder das adeno-assoziierte Virus Typ 2 (AAV-2), deren Reifung von der Differenzierung der Wirtszellen abhängig ist [150, 158], wäre diese Adaptation der Kultivierung von NHEK in weiteren Versuchen jedoch sinnvoll.

4.2.2. Polarisation

Ein kritischer Punkt für die Verifizierung eines in vivo-ähnlichen Verhaltens von Zellen in vitro ist das polarisierte, also asymmetrische Wachstum der Zellen im jeweiligen Modell [218]. Dieses bestimmt neben morphologischen Unterschieden auch die Funktionalität der Zellen bzw. der unterschiedlich ausgerichteten Zelldomänen [219, 220]. Unter anderem konnte für Darmepithelzellen gezeigt werden, dass deren Differenzierung und somit auch Funktionalität in vitro von der Polarität abhängig ist und diese nur durch 3D-Zellkultivierung erreicht werden kann [221]. Generell besitzen Zellen drei Polarisationsdomänen. Während der basale Pol zum inneren Milieu, bei Epithelzellen also zur EZM bzw. Basallamina gerichtet ist, ist die apikale Domäne durch die Interaktion mit dem äußeren Milieu definiert, was bei Epithelzellen entweder die Außenwelt (Haut), das Lumen (Darm) oder das Zellkulturmedium (in vitro) darstellen kann. Die laterale Zelldomäne bestimmt den Kontakt zu benachbarten Zellen [222]. Für Epithelzellen in vivo wird die atypische Proteinkinase C (aPKC) als Teil des aPKC-Par3-Par6-Komplexes als eines der wichtigsten Proteine zur Erhaltung epithelialer Polarität beschrieben [223]. Die in vivo-typische apikale Expression der aPKC konnte in dieser Arbeit für NHEK und Vero E6-Zellen, die in 3D kultiviert wurden, über IHC nachgewiesen werden. Das in vivo basal exprimierte Bindungsprotein Integrin ß1 (ITGB1), welches im heterodimerisierten Zustand unter anderem für die Interaktion mit Kollagenen oder Fibronectin auf der EZM verantwortlich ist [224], konnte im 3D-Zellkulturmodell für beide Zelltypen ebenfalls in basaler Ausrichtung detektiert werden. In Monolayer-Kultur war im Kontrast dazu über IFA für keines der Proteine eine Polarisation nachweisbar. Hinsichtlich der Expression typischer Polarisationsmarker verhielten sich Zellen im etablierten 3D-Zellkulturmodell also deutlich physiologischer als korrespondierende Monolayer-Kulturen. Dies könnte im Infektionskontext zur Folge haben, dass durch die inhomogene Verteilung verschiedener Oberflächenproteine und die unterschiedliche Qualität der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte in den etablierten 3D-Zellkulturen im Vergleich zu den korrespondierenden Monolayer-Kulturen sowohl die Virusadhäsion als auch Weitergabe von Zelle zu Nachbarzelle beeinflusst sein könnte. Für Vaccinia Virus (VACV) Infektionen konnte z. B. gezeigt werden, dass eine Inhibition von ITGB1 zu einem schlechteren Viruseintritt in Monolayer-kultivierten HeLa-Zellen führte [225]. Bei Primärinfektionen in 3D-kultivierten Zellen sollte ITGB1 aufgrund der vorrangig basalen Expression jedoch kaum für die Viren zugänglich sein und somit keinen Einfluss auf den Viruseintritt in die Zelle haben.

4.2.3. Langzeitkultivierbarkeit

Neben den morphologischen Charakteristika 3D-kultivierter Zellen ist auch die verlängerte Kultivierungsdauer unter stabilen, wenig veränderlichen Bedingungen ein Merkmal von 3D-Zellkulturmodellen gegenüber Monolayer-Kulturen [103, 226].

Während Zellen, die auf Plastikoberflächen nach Erreichen voller Konfluenz in Ermangelung von physiologischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten ungehemmt weiterproliferieren, somit übereinander wachsen, sich gegenseitig die Nährstoffe entziehen und daher teils zugrunde gehen, erhalten Zellen in 3D-Kulturen nach dem Erreichen der maximalen Zelldichte durch Interaktionen mit den umliegenden Zellen molekulare Stoppsignale, durch die sich ihre Proliferationsrate verringert [227, 228]. Auch in dieser Arbeit konnte für Vero-Zellen und NHEK gezeigt werden, dass sich die Zellzahlen in 3D-Zellkulturen nach Erreichen der maximalen Zelldichte für mindestens zehn Tage nicht veränderten und auch die Zellviabilität in dieser Zeit auf konstantem Niveau verblieb. Ein Überwachsen der Zellen konnte somit, wie erwartet, nicht beobachtet werden. Im Vergleich zu konventionellen Monolayer-Kulturen war für Vero E6-Zellen zudem bis drei Wochen nach Erreichen voller Konfluenz ein unterschiedliches Apoptose- und Proliferationsverhalten zu beobachten. Während in Monolayer-Kulturen über den gesamten Kultivierungszeitraum eine konstant hohe Proliferationsrate und mit dem damit einhergehenden post-konfluenten Überwachsen der Zellen auch eine nährstoffmangelbedingte steigende Apoptoserate zu detektieren war, war in 3D-Kultur eine Regulation der Proliferation nachweisbar. Durch die post-konfluente Verringerung der Zellproliferation und der daraus resultierenden, vorher beschriebenen unveränderten Zellzahl über mehrere Wochen, war auch die Apoptoserate auf einem konstant niedrigen, tendenziell sogar sinkendem Niveau bis zum Ende des Versuchs nach vier Wochen Kultivierungsdauer. Ähnliche Phänomene im differentiellen Apoptoseverhalten zwischen 3D- und Monolayer-Kulturen konnten auch von anderen Forschungsgruppen demonstriert werden [214, 229]. In einem EZM-basierten 3D-Zellkulturmodell konnte zudem eine direkte Korrelation zwischen der verringerten Apoptoserate, der damit einhergehenden längeren Kultivierbarkeit und der ITGB1 vermittelten Interaktion der Zellen mit der EZM nachgewiesen werden [230].

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit für NHEK über IHC/IFA ermittelt werden, dass die Proliferationsrate in 3D-Zellkultur nach Erreichen der maximalen Zellzahl mit der von Keratinozyten in der basalen Schicht humaner Haut *in vivo* korrelierte und folglich zwischen 10 und 20 % lag [231]. Die Proliferationsrate in NHEK-Monolayer-Kulturen lag hingegen bei > 50 %. Zellen im hier etablierten 3D-Zellkulturmodell verhielten sich also vergleichbar zu anderen 3D-Ansätzen *"in vivo*ähnlich" und sind für Langzeit-Zellkulturexperimente aufgrund ihres nahezu unveränderten Verhaltens hinsichtlich zellulärer Integrität und Stabilität konventionellen Monolayer-Kulturen vorzuziehen. Im Infektionskontext wäre dies vor allem für den Nachweis und die Erforschung langsam replizierender Viren von großer Relevanz, da diese in konventionellen Monolayer-Kulturen aufgrund der kürzeren Kultivierbarkeit nicht zu genügend hohen Titern reifen könnten. Ein weiterer Ansatzpunkt unter vielen wäre die Erforschung von langfristigen zytotoxischen Effekten von antiviralen Therapien auf die Wirtszellen, welche in Monolayer-Kulturen nicht möglich ist.

4.2.4. Molekulare Marker

Durch wiederholte vergleichende Transkriptomanalysen von nicht-infizierten 3D- und Monolayer-NHEK-Kulturen und unter Einbeziehung von Daten aus der vergleichenden Transkriptomanalyse in vitro generierter Haut mit Monolayer-kultivierten NHEK [201] konnten molekulare Marker identifiziert werden, die als spezifisch für das jeweilige Kultivierungsmodell bzw. mutmaßlich für ein physiologisches Verhalten von primären humanen Keratinozyten klassifiziert werden konnten. In jedem der Vergleiche verschiedener 3D-Ansätze mit den korrespondierenden Monolayer-Kulturen war eine Vielzahl von Genen stärker exprimiert, die in die Epidermis-Entwicklung bzw. die Keratinozyten-Differenzierung involviert waren. Diese differentielle Expression war im Hautmodell am stärksten ausgeprägt, was aufgrund der Physiologie dieses Kulturmodells für die biologische Relevanz der erhobenen Daten spricht. Es konnten insgesamt 124 Gene identifiziert werden, deren Expression zwischen dem in dieser Arbeit etablierten 3D- und dem Monolayer-Zellkulturmodell in zwei Transkriptomanalysen, die um mehrere Monate zeitversetzt durchgeführt wurden, signifikant hochreguliert waren. Diese "verifizierten" 3D-Marker konnten vor allem gewebetypischen biologischen Prozessen wie der Angiogenese und der Immunantwort zugeordnet werden - beides elementare Faktoren bei der in vitro Nachbildung von Organen. Während durch eine Gefäßneubildung auch tiefer im jeweiligen Gewebe liegende Zellen mit Sauerstoff versorgt werden können [232], kann durch die stärkere Expression von Zytokinen und anderen Immunantwortassoziierten Proteinen die Interaktion mit benachbarten Zellen und Geweben sichergestellt und eine Abwehr gegen äußere Einflüsse wie zum Beispiel Infektionen aufgebaut werden [233]. Von den identifizierten 3D-Markern wurden fünf ausgewählt und zu Verifizierungszwecken im Detail nachanalysiert, wobei diese jeweils fünf Kriterien erfüllen mussten. Neben einer hinreichenden biologischen Relevanz im 3D- bzw. Infektions-Kontext, sollten sie mit einem p-Wert von < 0,001 mindestens um den Faktor 10 stärker exprimiert sein als in Monolayer-Kultur. Zum Zwecke der genaueren und einfacheren Nachweisbarkeit mittels qPCR mussten in der Transkriptomanalyse zudem mehr als 1000 Reads vorhanden sein und es mussten für nachfolgende Analysen auf Proteinebene kommerzielle Antikörper zur Verfügung stehen. Dementsprechend wurden für die Verifizierung Caspase 14 (CASP14), Calmodulin-like protein 5 (CALML5), RNase 7 (RNASE7), Desmocollin-1 (DSC1) und der Interleukin 1 Rezeptor Typ 2 (IL1R2) ausgewählt. Während die ersten vier Gene bereits mehrfach im Zusammenhang mit differenzierenden Epithelzellen und zum Teil terminal differenzierenden Keratinozyten in der Haut beschrieben wurden [234-237], ist die erhöhte Expression von IL1R2 durch Hautzellen bisher nur inflammationsassoziiert bekannt. Hier wirkt das resultierende Protein als Decoy-Rezeptor für IL-1, um inflammatorische Prozesse lokal begrenzt zu halten [238].

Die Aktivität von CASP14 ist auf die Haut begrenzt und hat im Gegensatz zu den meisten anderen bekannten Caspasen keinen pro-apoptotischen sondern einen protektiven Einfluss auf das Gewebe, da durch sie die Keratinisierung der Haut unterstützt wird [235]. Das Calcium-bindende CALML5 und das Tight Junction Protein DSC-1 sind ebenfalls eng mit der terminalen Differenzierung menschlicher Haut assoziiert und *in vivo* bzw. im *in vitro* Hautmodell ausschließlich im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* lokalisiert [236, 237]. Eine Biosynthese des antimikrobiellen Peptids (AMP) RNASE7 konnte bereits in verschiedenen somatischen Geweben nachgewiesen werden [239]. In mehreren Studien konnte für RNASE7 *in vitro* eine antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien und Hefen demonstriert werden, eine antivirale Wirkung war jedoch nicht nachweisbar [240]. In humaner Haut konnte RNASE7 vorrangig in den äußeren Schichten detektiert werden [234]. Die biologische Relevanz in Haut konnte durch eine Inhibition der RNASE7 mit neutralisierenden Antikörpern evaluiert werden, durch die die antimikrobielle Wirkung gegen *E. faecium* reduziert werden konnte [241].

Die differentielle Expression aller fünf Gene konnte mittels qPCR für den in der Transkriptomanalyse betrachteten Zeitpunkt verifiziert werden. Zudem konnte an drei weiteren Messpunkten einer Wachstumskinetik eine signifikant mehr als zehnfach höhere Expression für jedes der Gene nachgewiesen werden. Die Expressionsunterschiede zwischen NHEK, die auf Kollagen I-beschichteten Zellkulturplatten und in 3D-Kultur kultiviert wurden, waren für CASP14, CALML5 und DSC1 dagegen abhängig vom analysierten Zeitpunkt und nur für RNASE7 und IL1R2 im 3D-Zellkulturmodell durchgängig höher. Dies deutet zumindest partiell auf eine post-konfluente, zeitabhängige Angleichung der Kollagen I- an 3D-Kulturen hin, die u. U. aus verstärkten Interaktionen der NHEK mit der beschichteten EZM-Komponente und daraus resultierenden Differenzierungsprozessen resultierte. Die Verifizierung auf Proteinebene war lediglich für zwei der fünf 3D-Marker erfolgreich. Mittels IHC konnte eine deutlich stärkere Bildung von CASP14 in uninfizierten 3D- gegenüber Monolayer-kultivierten NHEK nachgewiesen werden und im Western Blot war nur im 3D-, nicht aber im Monolayer- und Kollagen I-Zellkulturmodell eine zeitunabhängige Bildung von RNASE7 detektierbar. Ob für die anderen drei Marker tatsächlich keine differentielle Proteinbiosynthese zwischen den Zellkulturmodellen nachweisbar ist oder andere Faktoren wie eine zu geringe Sensitivität der Antikörper für den fehlgeschlagenen Nachweis verantwortlich waren, ließ sich nicht zweifelsfrei klären.

Eine weitere Untermauerung der Qualität der identifizierten 3D-Marker auf mRNA-Ebene stellte die erfolgreiche Detektion in 3D-kultivierten Vero E6-Zellen dar. Während in Monolayer-Kultur lediglich ein Nachweis des *IL1R2* per qPCR auf geringem Level erfolgreich war, war die mRNA-Expression der anderen vier Gene nicht detektierbar. In 3D-Kultur wurde dagegen in jedem getesteten Setup die Expression von *CALML5* und *RNASE7* und zum Teil auch von *CASP14* und *DSC1* induziert.

Die Expression von *IL1R2* war zudem im Vergleich der uninfizierten Vero-Präparate in 3D-Kultur leicht hochreguliert. Die aus den Transkriptomanalysen selektierten molekularen Marker für dreidimensionales Wachstum sind somit nicht nur keratinozytenspezifisch, sondern können zumindest zum Teil auch für andere Epithelzellen übernommen werden.

Neben den Markern für 3D-spezifisches Wachstum wurde bei NHEK-Kultivierungen auch die Proteinbiosynthese dreier Hautdifferenzierungsmarker überprüft, um den Grad der Physiologie der Zellen bei den verschiedenen Kultivierungsarten – inkl. humaner Haut selbst - zu überprüfen. In 3Dund Monolayer-Kulturen, die mit dem normalen, wenig calciumhaltigen KGM2 Wachstumsmedium kultiviert wurden, war lediglich Cytokeratin 14 (CK14) als Marker für die basale Schicht proliferierender Keratinozyten in menschlicher Haut (Stratum basale) mit starker Intensität detektierbar [242]. In humaner Haut und 3D-Kulturen, die mit stark calciumhaltigem Medium kultiviert wurden, war dagegen ein einander ähnliches, in der Literatur hinlänglich für Haut beschriebenes, Expressionsprofil zu erkennen. Die zur EZM gerichteten, basalen Zellen waren positiv für CK14, die darüber liegenden Schichten in der Haut (u. a. Stratum granulosum) zeigten eine Expression für Cytokeratin 10 (CK10) und die abgeflachte, verhornte, apikale Schicht der Keratinozyten (Stratum corneum) war durchweg positiv für den terminalen Differenzierungsmarker Involucrin [243, 244]. Während die Abgrenzung von CK10 und Involucrin in der Haut sehr gut möglich war, konnte in 3D-Kultur keine klare Trennung dieser beiden Marker erkannt werden, da u. a. zu wenige Zellschichten vorhanden waren. Eine Tendenz zur gewebetypischen Differenzierung war durch diese Art der Kultivierung jedoch eindeutig erkennbar.

4.3. Einfluss der Kultivierungsmethode auf die Infektion

Wie schon für die 3D-Kultivierung im Allgemeinen diskutiert (siehe 4.2), ist mit steigender physiologsicher Relevanz des verwendeten Zellkultursystems in der Infektionsforschung eine realistischere Übertragbarkeit von aus *in vitro* Versuchen abgeleiteten Erkenntnissen auf weiterführende *in vivo* Ansätze oder das *in vivo* Geschehen im Allgemeinen möglich. Von verschiedenen Forschungsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Verwendung komplexer Zellkulturmodelle *in vivo*-ähnliche Virusreifung, Wirtszellantworten und Reaktionen auf antivirale Therapien zu erzielen sind. Erst in 3D-Kulturen der Haut war eine vollständige Reifung humaner Papillomviren (HPV) und bestimmter Adeno-assoziierter Viren (AAV-2) möglich [150, 158]. In neuronalen Sphäroiden wurden kürzlich Mikrozephalie-ähnliche morphologische Veränderungen der 3D-Kulturen während einer ZIKA Virus Infektion festgestellt [184].

Und für die antivirale Therapie von Infektionen mit verschiedenen Spezies der in dieser Arbeit untersuchten Orthopockenviren (OPV) konnte eine differentielle Reaktion der Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturmodells beobachtet werden [133, 245]. Allgemein liegen Bedenken nahe, nach denen viele Erkenntnisse, die aus konventionellen Monolayer-Infektionsstudien *in vitro* gewonnen wurden, nicht oder nur zum Teil der *in vivo*-Situation gerecht werden und u. a. deswegen viele Therapieansätze in späteren klinischen Studien scheitern [96, 103].

Entsprechend der 3D-Kultivierungsversuche ohne infektiöse Erreger weisen auch Infektionsversuche in 3D-Zellkultur ähnliche Charakteristika gegenüber konventionellen Monolayer-Kulturen auf.

Neben der bereits angesprochenen höheren Variabilität der Präparate untereinander, welche jedoch eher dem *in vivo* Geschehen entspricht als die größere Homogenität der Monolayer-Kulturen, sind für Infektionsversuche mit 3D-Zellkulturen in der Regel ein höherer Arbeits- und Kostenaufwand und eine größere fachliche Expertise notwendig. Zudem müssen Präparate vieler Zellkulturmodelle für eine längere Zeit vorkultiviert werden, bis sie für die Infektion bereitstehen [246-248]. Weiterhin ist die lichtmikroskopische Analyse der zellulären Reaktion auf die Infektion, z. B. in Form eines zytopathischen Effekts (CPE), in 3D-Kulturen nicht online möglich, da diese durch ihre strukturelle Komplexität nicht genügend lichtdurchlässig sind [249].

Das in dieser Arbeit etablierte 3D-Zellkulturmodell ist jedoch hinsichtlich vieler dieser Punkte unproblematischer als komplexere Ansätze. Im Vergleich zum für OPV-Versuche bereits verwendeten Hautmodell [133] ist der Arbeitsaufwand und die fachliche Expertise, die für die Generierung der Präparate sowie die anschließende Infektion benötigt werden, verringert. Außerdem beträgt die Vorkultivierungszeit bis zum Start der Infektion nach dem etablierten Protokoll lediglich sieben Tage und kann durch Erhöhung der ausgesäten Zellzahlen bei Bedarf reduziert werden. Im Vergleich dazu müssen 3D-Hautkulturen bis zum Erreichen einer ausreichenden Differenzierung bis zu 14 Tage vorkultiviert werden [248].

Aufgrund der Undurchlässigkeit für Licht, musste jedoch eine Alternative für die in Monolayer-Versuchen übliche lichtmikroskopische Verifizierung der Infektion und deren online Weiterverfolgung etabliert werden. Hierfür wurden für den direkten Nachweis der Infektion und deren Lokalisierung im Präparat in jedem Infektionsversuch Kryoschnitte präpariert und diese fluoreszenzmikroskopisch u. a. auf die vom rekombinanten CPXV ausgehende grüne Fluoreszenz des GFP analysiert. Als Surrogat für einen etwaig auftretenden CPE wurde zudem standardmäßig die Veränderung der Zellviabilität infizierter Präparate über die Zeit bestimmt.

Auf den nachfolgenden Seiten wird der Einfluss der Kultivierungsmethode auf die Infektion (4.3.1 bis 4.3.3) und der Einfluss der Infektion auf die Wirtszellen in Abhängigkeit des Zellkulturmodells (4.3.4 bis 4.3.7) diskutiert. Zudem wird die differentielle Wirksamkeit des untersuchten antiviralen Wirkstoffes Gefitinib für eine CPXV-Infektion in 3D- und Monolayer-Kultur diskutiert (4.3.8).

4.3.1. Infizierbarkeit und Virusreplikation

Die Fähigkeiten eines Virus, in die Wirtszelle einzudringen und zu replizieren, sind zentrale Aspekte, die durch die Etablierung und Verwendung neuer Zellkulturmodelle für Infektionsversuche untersucht werden können. Während es z. B. für Noroviren für eine lange Zeit mit Hilfe konventioneller Monolayer-Kulturen nicht möglich war, Zellen *in vitro* überhaupt zu infizieren, konnte für Hepatitis C Viren (HCV) zwar eine zum Teil langwierige Persistenz in 2D-kultivierten Zellen nachgewiesen werden, die aber letztlich zu keiner nachweisbaren Replikation führte [97, 98]. Erst durch komplexe Anpassungen der Kultivierungsbedingungen für HCV bzw. die Etablierung eines geeigneten 3D-Zellkulturmodells für Noroviren konnte jeweils eine initiale Infektion inkl. Replikation und viraler Morphogenese und somit auch die umfassende Erforschung dieser verschiedenen Reifungsschritte der jeweiligen Erreger ermöglicht werden [166, 250]. Für CPXV konnte in verschiedenen Monolayer-Zellkulturmodellen zwar eine uneingeschränkte Infizierbarkeit und Replikation beschrieben werden, jedoch brachte die Erforschung des Virus im physiologischeren 3D-Hautmodell aufgrund von Differenzierungsprozessen der Keratinozyten einen erschwerten Viruseintritt in die Zellen mit sich [169].

In dieser Arbeit konnte dagegen in jedem der verwendeten Modelle eine Infizierbarkeit der Zellen für CPXV gewährleistet werden. Beim Standardkultivierungsverfahren des in dieser Arbeit etablierten 3D-Zellkulturmodells für NHEK, bei dem die Zelldifferenzierung nicht aktiv induziert wurde, war die Infizierbarkeit der Zellen gegenüber dem 3D-Hautmodell eindeutig erhöht, da zum einen keine biologische Barriere in Form einer Hornschicht ausgebildet wurde und zum anderen die Zellen zum Großteil einschichtig auf der EZM vorlagen und somit direkt durch das Virus adressierbar waren. Trotz dieses scheinbar Monolayer-artigen Verhaltens konnte für 3D-kultivierte NHEK im Vergleich zur Monolayer-Kultivierung ein vom Infektionssetup abhängiger, unterschiedlicher Verlauf der Virusreplikation nachgewiesen werden. Bei CPXV-Infektionen mit einer geringen initialen Viruslast, also der Virusverbreitung über Sekundärinfektionen, startete die Virusreplikation in 3D-Kultur etwas verzögert, sodass 24 h *p.i.* deutlich weniger virale Proteine und Genomäquivalente zu detektieren waren, als in Monolayer- und Kollagen I-Kultur. Bereits 48 h *p.i.* war für keinen dieser Parameter mehr ein Unterschied zwischen den Modellen auszumachen und auch auf Transkriptomebene waren lediglich drei von 229 viralen Transkripten zwischen 3D- und Monolayer-Kultur differentiell exprimiert, was für eine hochgradig synchron verlaufende Infektion spricht.

Ein Unterschied der Virusreplikation war somit vorrangig in der Etablierungsphase der Infektion detektierbar, was zum einen an einer generell schlechteren Infizierbarkeit der Zellen und daraus resultierend weniger infizierten Zellen zu frühen Analysezeitpunkten liegen könnte. Zum anderen könnte auch eine verzögerte Infektion oder ein nach Infektion verlangsamter Beginn der Virusreplikation und -transkription für die Verzögerung verantwortlich sein.

Eine generell modellabhängig verlangsamte Virusreplikation ist aufgrund der sukzessiven Angleichung der Infektionsparameter über einen längeren Infektionszeitraum als unwahrscheinlich anzusehen. Noch deutlicher war die Verzögerung der Virusreplikation bei der Betrachtung von Primärinfektionen mit hoher initialer Viruslast ausgeprägt. Während in Monolayer- und Kollagen I-Kulturen bereits 8 h p.i. fluoreszenzmikroskopisch GFP-positive Zellen detektiert werden konnten und somit also bereits die späte Virusprotein-Synthese eingesetzt hatte, waren keine Fluoreszenzsignale in 3D-Kultur nachzuweisen. 18 h p.i. wiesen > 90 % aller Monolayer- und Kollagen I-kultivierten Zellen eine CPXV-kodierte grüne Fluoreszenz auf, in 3D-Kultur war dagegen nur ein Bruchteil der Zellen GFP-positiv. Die Bildung viraler mRNA und GE korrelierte mit diesen Beobachtungen. Vergleichende Transkriptomanalysen von 3D- und Monolayer-Präparaten 4 h und 8 h p.i. offenbarten zudem, dass in 3D-Kultur eine große Zahl von intermediären und späten Virustranskripten zum frühen Zeitpunkt herunterreguliert und zum späten Zeitpunkt eine große Zahl von frühen Virustranskripten hochreguliert war. Diese Ergebnisse untermauern nochmals die Hypothese der verzögerten Infektion oder sich langsamer etablierenden Virusreplikation und transkription in 3D-Kultur, da eine schlechtere generelle Infizierbarkeit der Zellen sich nicht in der zeitversetzten Transkription von Virusgenen unterschiedlicher Phasen widerspiegeln würde.

Die Infizierbarkeit und Virusreplikation in der Vero E6-Zelllinie verlief im Gegensatz zur Infektion der primären Epithelzellen in allen getesteten Zellkulturmodellen unabhängig vom Infektionssetup sehr ähnlich. Sowohl die Virusverbreitung auf mikroskopischer Ebene als auch die Synthese viraler mRNA, GE und Proteine wiesen ähnliche zeitliche Verläufe auf, wobei die virale Genomreplikation und Proteinbiosynthese in Monolayer-Kultur über die gesamte Dauer der Kultivierung erhöht war. Ein detaillierter Vergleich auf Transkriptomebene wurde aufgrund der geringeren biologischen Relevanz der Vero E6-Zellen im Vergleich zu humanen Primärzellen nicht durchgeführt.

4.3.2. Virusreifung und Infektiosität

Trotz nachgewiesener erfolgreicher Infektion mit anschließender Replikation ist nicht zwangsläufig auch die abschließende Reifung der Viruspartikel gewährleistet, wie für humane Papillomviren (HPV) unter Standard Monolayer-Kultivierungsbedingungen gezeigt wurde [99]. Auch dieses Problem konnte mit Hilfe von 3D-Zellkulturen gelöst werden, wodurch erstmals eine vollständige HPV-Morphogenese *in vitro* erreicht werden konnte [150].

Im Gegensatz dazu verlief die Reifung von CPXV Viruspartikeln hinsichtlich der Virusmorphogenese von CPXV in 3D- und Monolayer-Kultur für NHEK und Vero E6-Zellen sehr ähnlich. Es konnten in allen Zellkulturmodellen elektronenmikroskopisch sämtliche bekannten intrazellulären Zwischenformen und infektiösen Virionenformen nachgewiesen werden [33].

Es wurden keine hochauflösenden Aufnahmen der Überstände gemacht, weshalb die Bildung extrazellulärer Viren (CEV oder EEV) nicht analysiert werden konnte [251].

Die Bildung infektiöser Einheiten (PFU) war zum Teil von der Kultivierungsart abhängig. Während für NHEK bei einer hohen initialen Viruslast nach einer für Monolayer-Kulturen typischen Dauer eines kompletten Virusreplikationszyklus von 18 h sowohl im Zellkulturüberstand als auch intrazellulär ca. 100 Mal mehr PFU pro Zelle in Monolayer- als in 3D-Zellkultur nachzuweisen waren, waren bei niedrigen initialen Viruslasten keine Unterschiede zu detektieren. In Vero E6-Kulturen konnten dagegen keine Infektionssetup-spezifischen Unterschiede nachgewiesen werden, jedoch war die Ausschleusung infektiöser Viren aus den Zellen in den Zellkulturmodellen unterschiedlich ausgeprägt. Intrazellulär waren nur geringfügige Unterschiede zu allen analysierten Zeitpunkten erkennbar, in den Überständen waren jedoch bei geringen initialen Viruslasten 48 h *p.i.* und nachfolgend etwa 100 Mal mehr PFU in Monolayer-Kultur als in 3D-kultivierten Vero-Zellen nachweisbar. Zellkultivierungen auf Kollagen I-beschichteten Zellkulturplatten brachten in den Überständen ähnliche Titer wie im 3D-Zellkulturmodell hervor.

Die Effizienz der Virusreifung, die für diese Arbeit als das Verhältnis von gebildeten infektiösen Einheiten (PFU) zu detektierten viralen GE definiert wurde, war in allen Infektionssetups vom Zellkulturmodell abhängig. Sowohl in NHEK als auch in Vero E6-Zellen konnten in Zelllysaten und in Zellkulturüberständen an den meisten analysierten Zeitpunkten deutlich höhere Reifungsgrade in 3Dals in Monolayer-Kultur erzielt werden. Es konnten durchschnittlich ca. zehn Mal mehr PFU pro GE in 3D-Kulturen nachgewiesen werden. Für NHEK waren zudem Zellkulturmodell-unabhängig ähnliche Reifungsgrade in Zelllysaten und Überständen zu detektieren, in Vero E6-Zellen war die intrazelluläre Virusreifung dagegen deutlich effizienter als im Überstand. Das Verhältnis von PFU zu GE in Zellkulturüberständen von Kollagen I-kultivierten Zellen war dem von 3D-Kulturen sehr ähnlich.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass sowohl Qualität als auch Quantität der Virusreifung stark vom verwendeten Zellkulturmodell abhängig ist. Für eine effizientere, "reinere" Virusreifung, die von weniger nicht-infektiösen Partikeln begleitet wird, sind das 3D- und das Kollagen I-Zellkulturmodell den Monolayer-Kulturen vorzuziehen. Dies könnte zum Beispiel für Virus-Wirt Interaktionsstudien oder detaillierte Strukturanalysen speziell von infektiösen Partikeln von Relevanz sein, da somit nicht-infektiöses Material, welches die relevanten Informationen maskieren könnte, in reduzierter Zahl vorhanden wäre.

4.3.3. Virusweitergabe auf uninfizierte Zellen

Aufgrund der grundlegend veränderten Morphologie, Organisation und Interaktion von Zellen in 3D-Zellkulturen gegenüber konventionellen Monolayer-Kulturen ist die Virusverbreitung von infizierten Zellen zu benachbarten oder weiter entfernten Zellen über Sekundärinfektionen ein kritischer Punkt in der Betrachtung des Infektionszyklus. Für verschiedene OPV Spezies ist die Verbreitung in Monolayer-Kulturen vorrangig über die intrazelluläre infektiöse Virionenform in Gestalt von IMV-Partikeln nach Zelllyse beschrieben. Die mit mehreren Membranen umhüllten extrazellulären Virionenformen EEV und CEV, die aus den infizierten Zellen aktiv ausgeschleust werden, um Zellen in unmittelbarer Umgebung zu infizieren, machen nur einen kleinen Anteil im Infektionsgeschehen aus [252]. Die Virusweitergabe in vivo in verschiedenen Geweben verläuft dagegen vorrangig über die aktive Virusweitergabe von infizierten zu benachbarten Zellen über die extrazellulären Virionen [253, 254]. Eine Infektion von Zellen in größerer Entfernung über die passive Freisetzung von IMVs ist allein aufgrund des mehrschichtigen Zellgeflechts und somit schlechter Zugänglichkeit von Körperfluiden als Verbreitungsquelle nur schlecht möglich. Zwar wurden in dieser Arbeit keine Analysen zur tatsächlichen Identität der Virionenformen im Zusammenhang mit der Virusweitergabe im Rahmen von Sekundärinfektionen durchgeführt, allerdings lassen sich anhand der generierten Ergebnisse und Ähnlichkeiten zur humanen Haut dahingehend einige Hypothesen ableiten. Zum einen verhalten sich 3D-kultivierte Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie, differenzierungsspezifischer Marker und Polarisation sehr in vivo-ähnlich, wonach auch ein ähnliches Verhalten im Infektionskontext und speziell in der Virusweitergabe naheliegt. Zum anderen kann als Surrogat für das Verhältnis von Infektionen, die über das Medium vermittelt werden und denen, die direkt von Zelle zu Nachbarzelle geschehen, das Verhältnis der intrazellulären und extrazellulären infektiösen Virustiter verwendet werden. Während für NHEK bei dieser Betrachtung keine Unterschiede zwischen 3D- und 2D-Kultivierung nachzuweisen waren, war das Verhältnis in Vero E6-Zellen unter den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen stark verschoben. Vor allem an späten Zeitpunkten der CPXV Infektion bei geringen initialen Viruslasten war der infektiöse Virustiter im Überstand von 3D-Kulturen etwa 100fach geringer als in korrespondierenden Monolayer-Kulturen, während intrazellulär keine Unterschiede der Titer zu analysieren waren. Dies ist ein klares Indiz für einen differentiellen Hauptinfektionsweg bei Sekundärinfektionen in beiden Zellkulturmodellen und kann zudem für eine Verschiebung des Verhältnisses verschiedener involvierter Virionenformen sprechen.

4.3.4. Morphologische Veränderungen der Zellen

Infektionen von Epithelzellen mit CPXV in vitro sind in Monolayer-Kulturen immer mit der Ausbildung eines zytopathischen Effekts (CPE) verbunden, der zunächst in Form von zytoskelettalen Umstrukturierungen ein Abkugeln der Zellen zur Folge hat und im weiteren Infektionsverlauf zur Lyse der infizierten Zellen führt [255]. In dieser Arbeit konnte für die primären NHEK sowohl in konventionellen Monolayer- als auch in Kollagen I-Kulturen in allen untersuchten Infektionssetups ein zeitabhängig fortschreitender, moderater CPE beobachtet werden. In 3D-Kulturen war eine solche Reaktion nur schwer festzustellen, da Zellen unter diesen Kultivierungsbedingungen zum einen ohnehin in ihrer Form kompakter sind als ausgestreckte Monolayer-Zellen und somit eine zytoskelettale Umstrukturierung nur schwer von der Ursprungsmorphologie zu unterscheiden wäre. Zum anderen wurden Analysen dieser Art zusätzlich dadurch erschwert, dass keine horizontale Sicht auf einen Zellrasen wie in Monolayer-Kultur, sondern lediglich vertikale Kryoschnitte und somit eine verringerte Anzahl von parallel zu betrachtenden Zellen verfügbar waren. Davon abgesehen waren jedoch zu keinem Zeitpunkt erhebliche Unterschiede zwischen infizierten Zellen, die durch die rekombinante GFP-Expression identifizierbar waren, und uninfizierten Zellen zu erkennen und auch keine auffälligen Lücken im Zellverband in infizierten Bereichen nachweisbar. In Studien, in denen der Einfluss der CPXV Infektion auf die Morphologie in vitro generierter Haut untersucht wurde, konnten, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit nachgewiesenen minimalen Einflüssen, ausgeprägte zytopathische Effekte in Form eines Aufblähens (ballooning) der Keratinozyten und der Ausbildung zytoplasmatischer Guarnieri Einschlusskörper detektiert werden [169]. Diese Phänomene konnten auch mehrfach in vivo in CPXV infizierter Haut nach lokaler und systemischer Infektion nachgewiesen werden [46, 256, 257]. Inwiefern allerdings eine realistische Remodellierung dieser physiologischen Reaktionen, in die zum Großteil auch immunologische Faktoren involviert sind, über 3D-Zellkulturmodelle ohne Immunzellen in vitro möglich ist, bleibt diskutabel.

Für alle Kultivierungsmethoden war auffällig, dass für NHEK auch nach langen Inkubationszeiten bei einer Vielzahl von Zellen keine Infektion und somit auch keine morphologischen Veränderungen nachweisbar waren und in keinem Setup eine Infektionsrate von > 50 % aller Zellen zu beobachten war. Mögliche Erklärungen hierfür könnten unterschiedliche Differenzierungsstadien einzelner Zellen sein, die u. U. eine Infektion verhindern oder erschweren können. Als Beispiel hierfür dient u. a. die terminale Differenzierung von Keratinozyten in Form einer Verhornung, die die Haut *in vivo* sehr effektiv vor Krankheitserregern und anderen äußeren Einflüssen schützt [258]. Aufgrund der Morphologie der hier betrachteten Zellen konnte eine Verhornung als mögliche Erklärung allerdings ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu CPXV Infektionen in NHEK war in allen verwendeten Vero E6-Zellkulturmodellen eine Infektion mit CPXV von nahezu allen Zellen möglich. Die morphologischen Veränderungen, die damit einhergingen, waren in Monolayer- und in Kollagen I-Kulturen sehr ähnlich und sehr stark ausgeprägt. Sämtliche infizierten Zellen durchliefen zunächst ähnlich wie bei NHEK eine Umstrukturierungsphase einhergehend mit zytoskelettale einem Abkugeln der von Zellkulturplattenoberfläche und wurden nach weiterer Inkubationszeit lysiert. In 3D-Präparaten war hingegen trotz eindeutigem Infektionsnachweis zu keinem mittels IHC untersuchten Zeitpunkt eine erhebliche Veränderung auf morphologischer Ebene nachweisbar. Wegen des dichteren Wachstums der Vero E6-Zellen im Vergleich zu NHEK in 3D-Kultur war trotz der Betrachtung des Zellrasens in vertikalen Schnitten ein klarer Unterschied zu den anderen Kultivierungsmethoden nachzuweisen. Das Ausbleiben des CPEs und somit auch der Zelllyse in 3D-Kultur korrelierte zudem mit den im Vergleich zu Monolayer-Kulturen geringeren Virustitern in den jeweiligen Überständen.

4.3.5. Einfluss auf die Zellviabilität

Die Erhaltung der Zellviabilität, also der Lebensfähigkeit einer Zelle, zum Zwecke der produktiven viralen Replikation, Reifung und Verbreitung ist von zentraler Bedeutung für verschiedene Viren. So ist zum Beispiel für viele Erreger bekannt, dass zur Verhinderung der Einleitung der Apoptose der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt Signalweg hochreguliert wird, um langzeitstabile Infektionen etablieren zu können [259]. Auch für CPXV konnte in verschiedenen Zelllinien bereits eine früh während der Infektion auftretende Aktivierung dieses Signalweges nachgewiesen werden, dessen Inhibition einen dramatischen Anstieg der Apoptose und einen starken Rückgang viraler Titer zur Folge hatte [260]. Daneben konnte in anderen Studien eine Vielzahl weiterer anti-apoptotischer, viabilitätssteigernder Mechanismen für verschiedene Virus-Wirt-Paare identifiziert werden [261]. Trotzdem haben die meisten Virusinfektionen, darunter auch die mit CPXV, langfristig negative Auswirkungen auf die Zellviabilität, die mit der Zelllyse und Virusfreisetzung einhergehen [262].

In dieser Arbeit konnte eine Zelltyp- und kultivierungsabhängige differentielle zeitliche Veränderung der Zellviabilität während einer CPXV Infektion nachgewiesen werden. Bei einer Infektion von NHEK mit hoher initialer Viruslast waren zwischen dem Monolayer- und dem 3D-Zellkulturmodell kaum Unterschiede zu detektieren. Im Gegensatz zu Monolayer-kultivierten Zellen konnte in 3D-Kultur eine zwischenzeitliche virusinduzierte Viabilitätssteigerung 8 h *p.i.* nachgewiesen werden. Nach 18 h war jedoch Zellkulturmodell-unabhängig bereits eine Verminderung der Zellviabilität um etwa 50 % zu detektieren, was im Monolayer zudem mit einem ausgeprägten CPE korrelierte. Bei der Untersuchung von Sekundärinfektionen war in 3D-Kultur 48 h *p.i.* bereits relativ früh während der Virusverbreitung eine Verminderung der Viabilität um 50 % erkennbar, die jedoch über den restlichen Kultivierungszeitraum nicht weiter abnahm.

In Monolayer-Kultur fiel die Viabilität dagegen erst ab 72 h *p.i.* ab und war 96 h *p.i.* auf einem deutlich höheren Level als in 3D-Kultur. Diese Verläufe korrelierten negativ mit den ermittelten viralen Transkripten, die in 3D-Kultur bereits früh ihr höchstes Expressionslevel erreichten und dort stagnierten und im Monolayer sukzessiv bis zum definierten Ende der Kultivierung 96 h *p.i.* stiegen.

Bei CPXV Infektionen von Vero E6-Zellen waren zwischen den Zellkulturmodellen dagegen teils erhebliche Unterschiede im Viabilitätsverlauf nachweisbar. Um nachzuvollziehen, welchem dieser Ansätze die Kollagen I-kultivierten Zellen bezüglich CPXV-abhängiger Lebensfähigkeit ähnlicher sind, wurde nachfolgend auch deren Viabilitätsabnahme in Folge einer Infektion analysiert. Bei einer MOI von 5 konnte in 3D- und in Monolayer-Kulturen bis 8 h p.i. ein leichter Anstieg der Viabilität im Vergleich zu korrespondierenden nicht-infizierten Präparaten verzeichnet werden. Während im Monolayer trotz gleichzeitig stark ausgeprägtem CPE weiterhin eine erhöhte Viabilität nachweisbar war, sank diese in 3D-Kultur auf etwa 75 % des Kontrollwertes. Große Unterschiede waren jedoch bei der Analyse von Sekundärinfektionen zu beobachten. Hier konnte in 3D-kultivierten Vero E6-Zellen bis 96 h p.i. keine bedeutende Veränderung der Viabilität nachgewiesen werden und auch weitere 72 h p.i. hatten die infizierten Zellen trotz vollständiger Durchinfektion noch eine Lebensfähigkeit von ca. 50 % der uninfizierten Kontrollen. In Monolayer-Kulturen war dagegen 96 h p.i. kaum noch eine Viabilität detektierbar. Dieser Abfall trat jedoch plötzlich und deutlich zeitversetzt zum infektionsbedingten CPE auf, der bereits 48 h p.i. stark ausgeprägt war. Kollagen I-Kulturen verhielten sich bei diesem Infektionssetup weder wie Monolayer-Kulturen, da sie 96 h p.i. noch eine erhebliche Restviabilität von > 20 % aufwiesen, noch wie 3D-Kulturen, da die Viabilität deutlich geringer war als in dem in dieser Arbeit etablierten Modell.

Der Zellkulturmodell-abhängige differentielle Verlauf der Zellviabilität in Vero E6-Zellen während einer CPXV Infektion war somit einer der am stärksten durch die Kultivierungsart beeinflussten Faktoren auf Wirtsebene. Scheinbar werden in 3D-Kulturen von Vero E6-Zellen während der Verbreitung über Sekundärinfektionen nur wenige Zellen lysiert, was mit der geringen Viruslast in den Zellkulturüberständen und den morphologischen Unauffälligkeiten der infizierten Zellen auf IHC-Ebene korrelierte. In dieser Arbeit konnte jedoch nicht geklärt werden, welche molekularen Mechanismen hinter dem unveränderten Zellstatus trotz hochgradiger Infektion verborgen sind und ob es sich dabei um ein gezieltes oder zufälliges Phänomen handelt. Vom evolutionären Standpunkt zeichnet sich laut "Trade-Off Hypothese" eine gute Fitness eines viralen Erregers nämlich nicht nur durch die Virusproduktion über einen möglichst langen Zeitraum sondern auch durch die damit ausbalancierte Freisetzung der infektiösen Partikel u. a. über die Schädigung der Wirtszellen aus, damit eine effektive Virusweitergabe auf möglichst viele Zellen, Organe bzw. Organismen erreicht werden kann [263].

Zumindest die Freisetzung des Virus über Zellschädigungen scheint in der Vero E6 3D-Kultur stark eingeschränkt zu sein, was im einfachen 3D-Infektionsmodell offensichtlich durch andere Mechanismen wie der direkten, nicht-destruktiven Weitergabe von Viruspartikeln von Zelle zu Nachbarzelle kompensiert werden kann [254]. Ob sich dies allerdings negativ auf die Virusverbreitung im systemischen Zusammenhang auswirken kann, müsste mit Hilfe komplexerer 3D-Ansätze wie der Organs-on-a-chip Technologie geklärt werden [134].

4.3.6. Differentielle Expression von Wirtszellgenen

Der Einfluss von CPXV Infektionen auf das Wirtszelltranskriptom konnte in der Vergangenheit lediglich einmal durch Microarray-basierte Analyse einer CPXV Infektion von HeLa-Zellen gezeigt werden [264].

In der hier vorliegenden Arbeit wurden erstmals NGS-basierte Transkriptomanalysen von Orthopockenvirus (OPV) Infektionen in Primärzellen durchgeführt. Neben dem konventionellen Monolayer-Ansatz wurden zudem Analysen im in dieser Arbeit etablierten 3D-Zellkulturmodell realisiert, die somit auch die ersten Transkriptomanalysen von OPV unter in vivo-ähnlichen Bedingungen darstellen. Unabhängig vom Zellkulturmodell befand sich unter den durch eine Infektion am stärksten signifikant hochregulierten Genen eine Gruppe von Transkripten, die für Histonproteine kodieren. Dieses Phänomen konnte schon in mehreren Studien zuvor gezeigt werden [32, 264]. Histon-mRNAs sind im Gegensatz zu den meisten eukaryotischen Transkripten nicht polyadenyliert und können somit im Normalfall nicht im poly(A)-abhängigen Sequenzierungsprozedere detektiert werden. Es wurde jedoch bereits beschrieben, dass während OPV Infektionen durch die virale Poly(A)-Polymerase de novo Polyadenylierungen von Wirtszelltranskripten, u. a. von Histon-mRNAs, vorgenommen werden, was letztlich zu einer fälschlichen Mehrdetektion der jeweiligen Transkripte im Vergleich zu nicht-infizierten Proben führte [265, 266]. Histon-mRNAs wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

Differentielle humane Genexpression im Rahmen von Sekundärinfektionen:

Durch die mittels Transkriptomanalyse generierten humanen Reads konnte in 3D-Kultur durchschnittlich eine um 15 – 20 % höhere Abdeckung des humanen Genoms erreicht werden als in Monolayer-Kultur. Erklärungen für dieses Phänomen sind zum einen eine um ca. 4 % geringere Komplettzuordnung der Reads zu annotierten Genen und eine um etwa 5 % erhöhte Diversität detektierter humaner Transkripte in 3D-Kultur. Es wurden also durch die physiologischere Kultivierung der NHEK mehr Gene und auch mutmaßlich mehr nicht-kodierende Bereiche exprimiert.

Beim Vergleich der mit einer geringen MOI infizierten Präparate waren trotz der geringen Zahl differentiell exprimierter viraler Gene (vgl. 4.3.1) mehr als 1000 humane Transkripte und somit ca. 7 % aller Gene im Vergleich von 3D- und Monolayer-Kultur reguliert. Unter den in 3D-Kultur hochregulierten Genen waren zahlreiche überrepräsentiert, die für Proteine kodieren, die in Abbauprozesse von Lipiden involviert sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass zelluläre Lipide für den Membranzusammenbau von Orthopockenviren benötigt werden und deren Metabolismus zu diesem Zweck durch das Virus verstärkt wird [267].

Bei Zellkulturmodell-internen Analysen war auffällig, dass durch eine CPXV-Infektion in Monolayer-Kultur absolut etwa zehnmal mehr Gene hoch- und mehr als 100 Mal mehr Gene herunterreguliert wurden als in korrespondierenden 3D-Kulturen, obwohl hinsichtlich der Virusgenexpression, gebildeter GE und PFU ein vergleichbares Stadium der Infektion analysiert wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine höhere Viruslast pro Einzelzelle in 3D-Kultur sein, wodurch insgesamt weniger Zellen infiziert wären, die ein infektionsbedingt verändertes Genexpressionsprofil aufweisen würden. Eine differentielle Expression vieler Gene würde somit im Hintergrund der uninfizierten Zellen verschwinden. Weiterhin wäre es auch möglich, dass eine Vielzahl der in Monolayer-Kultur durch eine Infektion regulierten Gene bereits im nicht-infizierten Zustand der 3D-Kulturen im Vergleich zu korrespondierenden Monolayer-Kulturen hochreguliert war. Tatsächlich waren 194 von 345 Genen (56 %), die im Monolayer durch die Infektion hochreguliert wurden, bereits vor der Infektion in 3D-Kultur höher exprimiert. Von den 949 Genen, die in Monolayer-Kultur durch die Infektion herunterreguliert wurden, waren 143 (15 %) bereits in uninfizierten 3D-Kulturen weniger stark exprimiert, was somit nur zum Teil die Unterschiede der CPXV-induzierten Genregulation erklären könnte. Eine dritte Möglichkeit besteht in einer zeitlich verzögerten differentiellen Expression der Wirtsgene in Folge der Infektion. Durch die Nachanalyse einiger regulierter Gene mittels qPCR konnte neben der bloßen Verifizierung der Genregulation auch eine teils verzögerte Expression von Genen detektiert werden. CASP14, CALML5 und DSC-1 waren beispielsweise zum Zeitpunkt der Transkriptomanalyse 48 h p.i. unreguliert und 24 h später jeweils etwa um ein zehnfaches herabreguliert. Dieses Verhalten könnte stellvertretend für viele andere Gene sein und im Zusammenspiel mit den beiden anderen genannten Möglichkeiten eine Erklärung für die geringere Zahl regulierter Transkripte in 3D-Kultur 48 h p.i. liefern.

Trotz der unterschiedlichen Anzahl regulierter Gene folgte speziell die infektionsinduzierte Hochregulation von Genen in beiden Zellkulturmodellen einem gezielten Muster. Sowohl Gene, die mit der zellulären Stressantwort als auch mit der Antwort auf externe Stimuli assoziiert sind, waren in beiden Modellen signifikant überrepräsentiert und entsprachen somit der Standardantwort der Zellen auf verschiedene Virusinfektionen [268].

In 3D-Kultur waren zudem Signaltransduktionsprozesse hochreguliert, die sowohl die effektive Replikation und Verbreitung des Virus als auch zellgesteuerte antivirale Prozesse unterstützen können [40, 269]. Für verstärkte antivirale Mechanismen in 3D-Kultur spricht zudem eine Vielzahl hochregulierter Gene, die für inflammatorische Proteine kodieren, die auch in anderen Studien bei OPV Infektionen nachgewiesen werden konnten [262, 270]. Nicht zuletzt waren durch die CPXV Infektion in 3D-Kultur auch Gene hochreguliert, die die Regulation der Apoptose negativ regulieren und somit eine effektivere Virusreplikation und -verbreitung unterstützen können [40, 260].

In Monolayer-Kultur wurde, ähnlich zur Verhinderung der Apoptose in 3D-Kultur, eine signifikante Überrepräsentation von proliferationssteigernden Genen nachgewiesen, was mit der zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* unverändert hohen Zellviabilität trotz Infektion korreliert. Die infektionsinduzierte Erhöhung der Wirtszellproliferation zur effektiven Virusvermehrung ist in der Literatur für eine Vielzahl von Erregern hinreichend belegt [271]. Weiterhin wurde durch die Infektion in Monolayer-Kultur die Expression von Genen hochreguliert, die Mikrotubuli-basierte Prozesse beeinflussen. Es ist bekannt, dass diese Prozesse während OPV-Infektionen zum einen den Transport der Viren bzw. Viruskomponenten durch die Zellen und aus den Zellen heraus fördern und dass sie zum anderen zum Teil für die Veränderung der Zellmorphologie verantwortlich sind [272-274]. Die Überrepräsentation dieser Prozesse speziell für die Monolayer-Kultur korreliert mit dem beobachteten CPE in Form von Abkugeln von Zellen durch eine CPXV Infektion, die in 3D-Kultur ausblieb.

Wie schon vorher erwähnt, konnten die Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse durch die Nachanalyse verschiedener differentiell regulierter Gene mit kommerziellen qPCR-Assays verifiziert werden. Da die Verifizierung für hoch-, herunter- und unregulierte Gene erfolgreich war, die Expressionen auf drei Referenzgene normiert wurden, die zeitlichen Expressionsverläufe für Wachstums- und Infektionskinetiken konsistent waren und die zuvor beschriebenen hochregulierten biologischen Prozesse plausibel in den Infektionskontext einzuordnen waren, ist die Annahme vertretbar, dass die erhaltenen Ergebnisse der Transkriptomanalysen realistisch und belastbar waren.

Differentielle humane Genexpression im Rahmen von Primärinfektionen:

Zu beiden analysierten Zeitpunkten (4 h + 8 h *p.i.*) wurde in 3D-Kultur durch die CPXV Infektion mit einer MOI von 5 die Expression von deutlich mehr Wirtszellgenen reguliert, als bei Analysen von Sekundärinfektionen 48 h *p.i.* Dies korreliert nicht mit der zuvor getroffenen Annahme, dass in dem in dieser Arbeit etablierten Zellkulturmodell die Infizierbarkeit gegenüber Monolayer-kultivierten Zellen eingeschränkt ist und somit die infektionsinduzierte Regulation der Genexpression durch die unregulierte Expression nicht-infizierter Zellen maskiert wird.

In 3D-Kultur waren 4 h p.i. mit 2,7 % dennoch weiterhin weniger Gene differentiell exprimiert als in Monolayer-Kultur (6 %). Während in 3D-Kultur etwa zwei Drittel aller Gene hoch- und ein Drittel herunterreguliert waren, hielt sich das Verhältnis im Monolayer zu diesem Zeitpunkt die Waage. 8 h p.i. waren dagegen in beiden Zellkulturmodellen etwa doppelt so viele Gene herunter- wie hochreguliert und absolut erheblich mehr Gene reguliert als zum frühen Zeitpunkt. Zudem war in 3D-Kultur mit 9 % abermals nur etwa die Hälfte der Gene reguliert, wie in Monolayer-Kultur (18 %), was insgesamt die Aussage stützt, dass der Eingriff auf das Wirtszelltranskriptom durch eine CPXV-Infektion in 3D-kultivierten Zellen geringer als in korrespondierenden Monolayer-Kulturen ist. Bei der Microarray-basierten Analyse von Primärinfektion in Monolayer-kultivierten HeLa-Zellen unter vergleichbaren Bedingungen (MOI = 5, 6 h p.i.) konnte in unserem Fachgebiet eine Regulation von ca. 4 % aller Wirtszellgene nachgewiesen werden. Zwei Drittel dieser Gene waren hoch-, ein Drittel herunterreguliert [264]. Diese Ergebnisse entsprechen von ihrer Tendenz in etwa dem frühen Analysezeitpunktes dieser Studie. Zu beiden analysierten Zeitpunkten konnte in 3D-Kultur eine signifikante Überrepräsentation von hochregulierten Genen nachgewiesen werden, die Einfluss auf Phosphorylierungsprozesse haben. Gemeinsam mit der Steigerung von Signaltransduktionsprozessen 4 h p.i., welche auch schon bei Sekundärinfektionen auftrat und häufig durch Phosphorylierungen von zellmembranassoziierten Rezeptoren eingeleitet wird, ergibt sich für Infektionen in 3D-Kultur ein starker genereller Eingriff auf die Verarbeitung vorrangig äußerer Einflüsse, die auf die Zellen wirken [275]. In diesem Zusammenhang ist zum Beispiel die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) durch ein virales Homolog des humanen epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) zum Zwecke der Proliferationssteigerung der Wirtszellen und der damit einhergehenden effektiven Virusverbreitung von OPV bekannt [85]. Entgegen diesem potentiell proliferationssteigernden Prozess war durch die CPXV Infektion in 3D-Kultur zu beiden Zeitpunkten die Expression von Genen hochreguliert, die das Zellwachstum negativ beeinflussen. Hierbei könnte es sich um einen aktiven Schutzmechanismus der Zelle vor der Replikation und Weitergabe der Viren handeln oder aber ein anti-apoptotischer Mechanismus zum Zweck der effektiven Virusreplikation sein, der durch das Virus induziert wurde [276]. Eine definitive Schutzfunktion stellen zudem die in 3D-Kultur hochregulierten inflammatorischen Gene wie CXCL10 und IL6 dar, die 4 h p.i. signifikant überrepräsentiert waren und zur Abwehr verschiedener viraler Erreger inkl. einiger OPV-Spezies in mehreren Studien beschrieben wurden [270, 277-279]. In beiden Zellkulturmodellen konnte eine erhöhte Expression von Genen nachgewiesen werden, die als Antwort auf das vermehrte Vorkommen ungefalteter Proteine induziert werden. Dabei handelte es sich vorrangig um Gene, die für Chaperone wie die Hitzeschockproteine HSPA1A und HSPA1B kodieren. Deren erhöhte Proteinbiosynthese unterstützt die Proteinfaltung und wurde bereits mehrfach im Kontext mit VACV Infektionen beschrieben [280, 281].

Allerdings war die Überrepräsentation dieser Gene in Monolayer-Kultur bereits 4 h *p.i.* und in 3D-Zellkultur erst 8 h *p.i.* nachweisbar, was abermals auf eine verzögerte Virusreplikation und -reifung unter *in vivo*-ähnlicheren Bedingungen hindeutet. In Monolayer-Kultur konnte zudem 8 h *p.i.* eine Hochregulation von proliferationssteigernden Genen und Genen, die in die Systementwicklung eingreifen, nachgewiesen werden. Diese könnten neben der effektiven Virusvermehrung auch, wie schon für die Sekundärinfektionen diskutiert, Umstrukturierungsprozesse des Zytoskeletts beeinflussen, die für den Transport von Viren oder Viruskomponenten verantwortlich sind [272, 274, 276, 282].

Insgesamt konnten anhand der generierten Transkriptomdaten und nachfolgender Analysen sowohl für Primär- als auch für Sekundärinfektionen mit CPXV Zellkulturmodell-spezifische und auch allgemein regulierte biologische Prozesse identifiziert werden, die im Infektionskontext von großer Relevanz sind und unter Umständen zur Identifikation von antiviralen Strategien beitragen könnten.

4.3.7. Differentielle Expression von Wirtszellproteinen

Transkriptomdaten können einen guten Überblick über die infektionsabhängige Veränderung der Wirtszellgenexpression geben und einen Eindruck vermitteln, welche biologischen Prozesse durch eine Infektion beeinflusst sein könnten. Allerdings konnten in der Vergangenheit mehrere Gruppen nachweisen, dass die Übertragbarkeit der so generierten Daten auf die tatsächliche funktionelle Ebene, also die Proteinexpression, nur begrenzt möglich ist [283-285]. Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Zum einen ist die Stabilität unterschiedlicher Transkripte und Proteine je nach biologischer Funktion teils erheblich verschieden [285]. Weiterhin können posttranslationale Aktionen, wie der proteolytische Abbau von neu synthetisierten Proteinen nicht einkalkuliert werden [286]. Und letztlich wird auch nicht die Gesamtheit der gebildeten Transkripte aus unterschiedlichen Gründen translatiert, u. a. aufgrund der zellulären RNA Interferenz über miRNAs, die potentiell simultan hunderte von Genen durch die Inhibition der mRNA Translation reprimieren können [287]. Proteomanalysen, die einen direkten Blick auf die Proteinexpression ermöglichen könnten, standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

Stattdessen wurde zur Verifizierung der generierten Genexpressionsdaten die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot zur semiquantitativen Auswertung bzw. mittels IHC/IFA zur Bestimmung der jeweiligen Proteinlokalisation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden aus den Transkriptomdaten mehrere entweder zwischen den Zellkulturmodellen oder durch eine CPXV Infektion differentiell exprimierte Gene ausgewählt und deren Proteinexpression zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* mit kommerziellen Antikörpern analysiert.

Für CASP14 konnte im 3D-Zellkulturmodell, korrelierend mit den Transkriptomdaten, mittels IHC eine Herabregulation in infizierten Präparaten nachgewiesen werden. Da sich diese spezifisch auf die infizierten Zellen in der Kultur beschränkte, war auch nachvollziehbar, warum die CASP14 mRNA-Expression und auch die Menge nachgewiesener Proteine mittels Western Blot während einer Infektionskinetik mit fortschreitender Zeit, mit der auch die Virusverbreitung fortschritt, stark absank. Es konnte also eine zu Monolayer-Kulturen komplett gegensätzliche virusinduzierte Expressionsentwicklung von CASP14 nachgewiesen werden, in denen durch die Infektion sogar eine zeitabhängige Hochregulation von CASP14 auf mRNA- und Proteinebene detektierbar war. CASP14 spielt eine entscheidende Rolle bei der terminalen Differenzierung von Keratinozyten und Defekte in deren Funktion waren direkt assoziiert mit einem unvollständigen Schutz der Haut vor Wasser und UVB-Strahlung [288]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CASP14 in einem 3D-Mundschleimhautmodell zu einer stärkeren Keratinisierung der Epithelzellen und somit potentiell zu einer Verbesserung der Abwehrfähigkeiten der Mundschleimhaut u. a. gegen Infektionen führte [289]. Damit einhergehend könnte also die Herabregulation in 3D-Zellkultur aktiv durch das Virus herbeigeführt worden sein, um einen effektiveren Übergang von Zelle zu Zelle durch die Schwächung zellulärer Barrieren zu ermöglichen. Da die Grundexpression von CASP14 in uninfizierten Monolayer-Kulturen deutlich geringer war als in 3D-Kulturen, war deren zusätzliche Herabregulation im Infektionskontext offenbar nicht für die Verbesserung der Virusweitergabe notwendig. IHC-Daten lassen vermuten, dass CASP14 u. U. sogar aus anderen, bisher unbekannten Gründen zur Unterstützung der Virusreplikation zu infizierten Bereichen rekrutiert wurde.

Das Hitzeschockprotein HSPA1B, welches in 3D-Kultur auf Transkriptebene zu keinem der untersuchten Zeitpunkten durch die CPXV Infektion reguliert war, war auf Proteinebene in infizierten 3D-Präparaten deutlich stärker exprimiert als in korrespondierenden uninfizierten Kontrollen. Die infektionsabhängige Hochregulation der HSPA1B Biosynthese bzw. die Rekrutierung von HSPA1B an den Infektionsort konnte bereits für mehrere Viren nachgewiesen werden und auch dessen positiver Einfluss auf die Virusreplikation und virale Proteinfaltung wurde in der Vergangenheit ausführlich beschrieben [290-292]. Auch eine wirtsgerichtete Therapie von Virusinfektionen durch die spezifische Inhibition des HSPA1B wurde diskutiert und konnte bereits erfolgreich *in vitro* gegen porcine Virusinfektionen (PRRSV) eingesetzt werden [293, 294]. In Monolayer-Kulturen war ebenfalls eine virusinduzierte Hochregulation von HSPA1B auf Proteinebene nachzuweisen. Im Gegensatz zur 3D-Kultivierung korrelierte diese jedoch mit den Expressionsdaten auf mRNA-Ebene. Des Weiteren war die Lokalisation der Proteine weniger diffus als in 3D-kultivierten NHEK und trat fokussiert in Bereichen starker Infektionen auf.

Für die Gene *IL1R2, MMP1* und *NR4A1*, deren mRNA-Expression in beiden Zellkulturmodellen durch eine CPXV Infektion stark hochreguliert wurde, war auch jeweils eine spezifische Erhöhung der Proteinbiosynthese auf IHC-Ebene nachweisbar.

IL1R2 konnte in beiden Kultivierungsmodellen im Zytoplasma infizierter Zellen detektiert werden. Als Decoy-Rezeptor bindet er zwar Interleukin 1 (IL-1), leitet aber im Gegensatz zum funktionalen Rezeptor IL1R1 aufgrund einer trunkierten zytoplasmatischen Domäne nach Bindung von IL-1 keine Signale ins Zellinnere weiter [295]. Somit kann die inflammatorische Wirkung des Interleukins durch die Kompetition beider Rezeptoren bei Bedarf durch einen endogenen Inhibitor ausbalanciert werden [238]. Im Infektionskontext konnte eine Hochregulation der IL1R2-Proteinbiosynthese bisher nur durch eine systemische Applikation von Lipopolysacchariden (LPS) im Hirn von Mäusen nachgewiesen werden [296]. Für Virusinfektionen wurde bisher noch kein Zusammenhang mit der Hochregulation des zellulären IL1R2 beschrieben, jedoch kodiert CPXV selbst für ein IL1R2 Analog, durch welches die antivirale Wirkung des IL-1 inhibiert werden kann [297]. Die intrazelluläre Lokalisation des IL1R2, die in dieser Arbeit für beide Zellkulturmodelle während einer CPXV Infektion nachgewiesen werden konnte, ist für den häufig membranständigen oder sezernierten Rezeptor zwar ungewöhnlich [298], konnte jedoch bereits im Zusammenhang mit antinekrotischen Wirkmechanismen beschrieben werden [299]. Somit liegt eine ähnliche Rolle des IL1R2 im Infektionskontext für beide Kultivierungsarten nahe.

In Korrelation zu den Transkriptomdaten war die Proteinbiosynthese der Kollagenase MMP1 in beiden Zellkulturmodellen durch die CPXV Infektion hochreguliert, die Lokalisation des Proteins war jedoch jeweils verschieden. In Monolayer-Zellkultur war eine starke Expression in unmittelbarer Nähe der Nuklei zu detektieren. Diese für MMP1 als EZM-modifizierendes Enzym eher unübliche Lokalisation konnte bereits in direkten Zusammenhang mit der Apoptoseverhinderung und verlängerter Zellviabilität im Tumorkontext gebracht werden [300]. Die extrazelluläre, EZMassoziierte Lokalisation des MMP1 in 3D-Zellkultur ist vor allem im in vivo Kontext hinlänglich beschrieben [301]. Im Zusammenhang mit zahlreichen Virus- und auch Bakterieninfektionen ist die MMP1 für den Abbau der Kollagenbestandteile der EZM in unmittelbarer Umgebung der infizierten Zellen und damit einhergehend für die Durchlässigkeit für einwandernde Leukozyten, die für die Bekämpfung der Infektion zuständig sind, verantwortlich [302, 303]. Zudem spielt MMP1 eine entscheidende Rolle beim anschließenden Abbau einiger Zytokine und Chemokine, die für die Rekrutierung der Immunzellen verantwortlich sind, um die Immunreaktion wieder einzudämmen [304]. Bei diesen Zytokinen handelt es sich u. a. um IL-1B [305], welches somit im 3D-Zellkulturmodell nicht nur intrazellulär (siehe IL1R2), sondern auch außerhalb der Zelle in seiner Wirkung unterdrückt wird.

Während durch MMP1 also die Immunantwort *in vivo* erst ermöglicht wird, kann eine zu hohe, unkontrollierte Expression, die auch durch den Erreger an sich induziert werden kann, zu einer verstärkten Gewebeschädigung und folglich Mortalität führen [306]. Eine Senkung der Mortalität während einer Pneumokokkeninfektion durch Inhibition der MMP1 Aktivität konnte bereits *in vivo* demonstriert werden [307, 308]. Ob die erhöhte Expression von MMP1 in der hier vorliegenden Arbeit auch durch CPXV induziert oder lediglich als Abwehrmechanismus durch die Zellen gesteuert wurde, ist eine sehr interessante Frage, die in nachfolgenden Studien geklärt werden sollte. Eindeutig ist jedoch, dass MMP1 in den beiden Zellkulturmodellen eine differentielle Funktion beikommt, wobei das Expressionsverhalten in der 3D-Zellkultur dem *in vivo* Zustand näher kommt.

Für die NR4A1 Expression wurden ähnliche Beobachtungen gemacht wie für MMP1. Der intrazellulären, teils im Nukleus beheimateten Lokalisation in Monolayer-Kultur stand die extrazelluläre, EZM-assoziierte Lage in 3D-Zellkultur in Folge einer CPXV-Infektion gegenüber. Als Transkriptionsfaktor, dessen Expression durch verschiedene physiologische und physikalische Stimuli erhöht werden kann, ist die kernständige Lokalisation des NR4A1, wie sie in Monolayer-Kultur beobachtet wurde, typisch im Zusammenhang mit der Induktion von inflammatorischen und Zellzyklus-regulierenden Prozessen [309]. Die Translokation in Mitochondrien ist zudem assoziiert mit der Einleitung der Apoptose und könnte somit in Monolayer-Kultur aufgrund der zum Teil zytoplasmatischen und nicht weiter definierten Lokalisation des NR4A1 ebenfalls eine Rolle spielen [310]. Im Zusammenhang mit Infektionen konnte in Makrophagen gezeigt werden, dass bei einer Stimulation mit LPS NR4A1 zum Teil für die Modulation der inflammatorischen Genexpression durch Transrepression der NF-kB Signalgebung verantwortlich ist [311]. Eine Hochregulation von NR4A1 bei E. coli-Infektionen von Endothelzellen induzierte zudem eine Herunterregulation verschiedener Zell-Zell-Interaktionspartner wie Claudin-5 und TJP1, durch die die Barrierefunktion der Zellen geschwächt und somit der Zelleintritt von E. coli vereinfacht wurde [312]. Der Einfluss erhöhter NR4A1 Expression auf die Virusinfektion wurde bisher noch nicht untersucht, könnte jedoch auf Grundlage der in dieser Arbeit generierten Daten zumindest in Monolayer-Kultur eine ähnliche Ausprägung besitzen wie für E. coli. Da eine extrazelluläre Lokalisation des NR4A1 in der Literatur bisher noch nicht beschrieben und diese im Zusammenhang mit der bekannten Funktion als Transkriptionsfaktor nicht nachvollziehbar ist, lassen sich keine Aussagen über deren Funktion in 3D-Zellkultur treffen.

4.3.8. Differentielle Sensitivität gegenüber antiviralen Substanzen

Eines von wenigen viralen Genen, welches bei Sekundärinfektionen von CPXV in NHEK zwischen den beiden Zellkulturmodellen differentiell reguliert war, war der Kuhpockenwachstumsfaktor (CGF). Beim CGF handelt es sich um ein Analog des humanen epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), welches früh im viralen Replikationszyklus exprimiert wird und den zellulären epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) stimuliert, wodurch dieser dimerisiert und phosphoryliert wird [282]. In Folge dessen kommt es zur Aktivierung der Ras/MEK/ERK-, Phospholipase C- und STAT-Signalwege, durch die die Zellproliferation gesteigert und die Apoptose inhibiert wird, was letztlich die CPXV Pathogenese fördert [83-86]. In einer früheren Studie konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit Gefitinib, einer Substanz, die bereits von der FDA für die Behandlung von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) zugelassen wurde [313], eine CPXV Infektion in humanen Monolayer-kultivierten Zelllinien inhibiert werden kann [87]. In anderen Studien konnte zudem gezeigt werden, dass unterschiedliche Kultivierungsbedingungen die Effektivität von antiviralen Substanzen beeinflussen können und dass Daten, die aus antiviralen Therapien in physiologischen, 3D-kultivierten Zellen gewonnen wurden, im in vivo Kontext zuverlässiger sein könnten, als korrespondierende Monolayer-Ansätze [66, 168, 248, 314]. Im Vergleich zu Infektionen in Monolayer-kultivierten Zellen konnte in dieser Arbeit für CPXV-Infektionen in 3D-Kultur neben der erhöhten CGF Proteinbiosynthese auch ein generell gesteigerter Einfluss der Signaltransduktion über GO-Term Analysen der Transkriptomanalysen und eine geringere Proliferationsrate infizierter Zellen nachgewiesen werden. Eine vergleichende Inhibitionsstudie mit Gefitinib in beiden Zellkulturmodellen schien somit aufgrund des beschriebenen Eingriffs auf proliferationsstimulierende Signalwege naheliegend.

In Monolayer-Kultur konnte lediglich bei der höchsten verwendeten Gefitinib Konzentration von 25 μ M eine signifikante Reduktion der CPXV Replikation erreicht werden. Während diese Konzentration bereits leicht zytotoxisch war, waren weiterhin kleine Virusplaques und phosphorylierter EGFR auf den Membranen infizierter Zellen zu detektieren. In 3D-Kultur war dagegen bereits bei der geringsten Gefitinib Konzentration von 0,5 μ M eine signifikante Reduktion der Virusreplikation und -verbreitung nachzuweisen. Bei 5 μ M Gefitinib war in 3D-Kultur eine fast vollständige Inhibition der CPXV Replikation erreicht, die von einer kompletten Inhibition der EGFR Phosphorylierung ohne zytotoxischen Effekt begleitet wurde. Es konnte somit zum ersten Mal für OPV Infektionen gezeigt werden, dass die Virusreplikation in 3D-Kulturen signifikant sensitiver gegenüber einer Behandlung mit antiviralen Substanzen im Vergleich zu korrespondierenden Monolayer-Kulturen sein kann. In anderen Arbeiten wurden bisher nur Unterschiede in der Kultivierungsmodell-abhängigen Selektivität antiviraler Substanzen, also dem Verhältnis von zytotoxischer zu effektiver antiviraler Konzentration, beschrieben [66].

In dieser Arbeit war die Selektivität von Gefitinib ebenfalls stark in 3D-Kultur erhöht, da die Zellviabilität in beiden Zellkulturmodellen sehr ähnlich verlief. Neben der Virusreplikation wurde in 3D-Kulturen auch die Zellproliferation bei weit geringeren, nicht-zytotoxischen Gefitinib Konzentrationen im Vergleich zu Monolayer-kultivierten NHEK signifikant reduziert [200]. Eine mögliche Erklärung für diese differentielle Antwort auf die Gefitinib Behandlung könnte der bereits erwähnte generelle, infektionsunabhängige Unterschied in der Zellproliferation für beide Kultivierungsmodelle sein. Proliferierende Zellen sind kritisch für die Infektion der meisten DNA-Viren [276]. In uninfizierten, 3D-kultivierten Zellen war die Proliferation deutlich geringer als in korrespondierenden Monolayer-Kulturen, was dem Status basaler Keratinozyten in humaner Haut entspricht [231]. Aus diesem Grund könnte zum Zweck einer effektiven Virusreplikation und ausbreitung eine Induktion der Zellproliferation im Anschluss an die initiale Infektion z. B. über eine erhöhte Expression des viralen EGF Homologs CGF notwendig sein, welche in 3D-Kultur 48 h p.i. tatsächlich um den Faktor zehn erhöht war. Zusätzlich wurde bereits beschrieben, dass die EGFR Expression auf der Oberfläche von 3D-kultivierten Zellen im Vergleich zu korrespondierenden Monolayer-Zellen deutlich geringer ist [315]. Daraus abgeleitet könnte in 3D-Kultur schon die Inhibition einer kleinen Zahl von EGFR pro Zelle erheblich kritischer und wirkungsvoller in Bezug auf die Herabregulation der Zellproliferation sein als in Monolayer-Kulturen. Zusammengefasst könnte also die Stimulation des EGFR in 3D-Kulturen aufgrund der generell reduzierten Zellproliferation in komplexen Zellkulturmodellen deutlich kritischer für die Virusreplikation sein als in Monolayer-Kulturen. Wegen der geringeren Expression des EGFR auf den Zellmembranen von 3D-kultivierten Zellen wurden zudem signifikant geringere Konzentrationen Gefitinib benötigt, um diesen effektiv zu inhibieren.

Da in 3D-kultivierten NHEK, im Gegensatz zu den in Monolayer-Kulturen ermittelten relativ hohen effektiven Hemmstoffkonzentrationen [87], bereits geringe und nicht-zytotoxische Gefitinib Konzentrationen ausreichten, um eine annähernd komplette Inhibition der CPXV Replikation und Ausbreitung zu erzielen und aufgrund der Tatsache, dass CPXV Infektionen in humaner Haut hauptsächlich lokal begrenzt bleiben [36], könnte eine lokale topische Anwendung von Gefitinib in nicht-toxischen Konzentrationen ein vielversprechender Ansatz für eine gut tolerierbare, effiziente Behandlung von CPXV Infektionen *in vivo* sein. Wegen der Genehmigung der FDA für die Behandlung von NSCLC könnte eine Off-Label-Nutzung von Gefitinib eine Option für eine Behandlung sein, wenn andere OPV Therapeutika kontraindiziert wären oder scheitern würden.

Da Gefitinib im Gegensatz zu den meisten anderen erprobten und experimentellen antiviralen Wirkstoffen ein Wirtsprotein und nicht das Virus an sich als Ziel besitzt, sind zudem auch Resistenzentwicklungen unwahrscheinlicher als bei Inhibitoren, die auf die Hemmung viraler Faktoren abzielen [316].

4.4. Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung eines 3D-Zellkulturmodells für die Untersuchung von Orthopockenvirusinfektionen. Die Modelletablierung erfolgte auf Grundlage einer dezellularisierten biologischen EZM mit Zelllinien und humanen Primärzellen unterschiedlichen Gewebeursprungs. Es konnte gezeigt werden, dass sich die uninfizierten Zellen in Abhängigkeit der Kultivierungsmethode sowohl auf morphologischer als auch auf molekularer Ebene deutlich voneinander unterschieden und dass das Verhalten 3D-kultivierter Zellen eher dem Zustand der korrespondierenden Zellen in vivo ähnelte. Der grundsätzliche Verlauf einer CPXV-Infektion auf Virusebene war trotz dieser Unterschiede relativ wenig von der Kultivierungsmethode beeinflusst. So war in 3D-kultivierten Zellen zwar eine effektivere Virusreifung nachweisbar, die Zahl infektiöser Viren pro Zelle, die CPXV Infektionskinetiken, die Virusmorphologie sowie das Virustranskriptom waren in 3D- und Monolayer-Kultur allerdings sehr ähnlich. Auf zellulärer Ebene waren dagegen auch bei einer Infektion deutliche Unterschiede zu erkennen. 3D-kultivierte Zelllinien waren im Vergleich zu korrespondierenden Monolayer-Kulturen erheblich länger im infizierten Zustand viabel und Primärzellen wiesen zwischen beiden Kultivierungsmethoden signifikante Unterschiede auf Transkriptomebene auf. Zudem führte die wirtsgerichtete antivirale Therapie mit dem EGFR Inhibitor Gefitinib in 3D-Kultur bei signifikant geringeren Konzentrationen als im korrespondierenden Monolayer zur effektiven Inhibition der Virusreplikation.

Im Vergleich zu konventionellen Monolayer-Zellkulturen ist das hier etablierte Infektionsmodell hinsichtlich der Handhabung und Vorkultivierungszeit zwar etwas arbeits- und zeitintensiver, jedoch können die in diesem Modell generierten Daten aufgrund des gewebeähnlichen Verhaltens der darauf kultivierten Zellen zu einer deutlich verbesserten Prädiktion des *in vivo* Geschehens beitragen. Mögliche Konsequenzen daraus könnten aufgrund besserer und gezielterer experimenteller Planung eine Reduktion der benötigten Tierversuchszahlen und geringere Durchfallquoten von etwaigen neuartigen (antiviralen) Medikamenten sein, die auf Grundlage von *in vitro* Vorergebnissen weiterentwickelt werden sollen, um sie letztlich in klinischen Studien zu erproben. Gegenüber vielen anderen, komplexeren und meist spezialisierten 3D-Zellkulturmodellen hat der in dieser Arbeit etablierte Ansatz den Vorteil der relativ einfachen Handhabung, der deutlich verringerten Präparationszeit bis zum Erhalt infizierbarer Zellkulturen und der hohen Modifizierbarkeit. Durch den Einsatz unterschiedlicher Zelltypen und/oder Kultivierungsbedingungen, wie zum Beispiel einer Erhöhung der Calcium-Konzentration, kann das Modell also auch für die Erforschung anderer Viren unter dreidimensionalen Bedingungen verwendet werden.

Nicht publizierte Vorergebnisse haben gezeigt, dass eine Infektion von 3D-Kulturen aus der Fibroblastenzelllinie BHK-21 mit dem in den meisten Säugetierzellen replikationsinkompetenten OPV-Impfstamm Modified-Vaccinia-Ankara (MVA) zu einer langandauernden, produktiven Bildung und Ausschleusung viraler Genomäquivalente führte. Eine Langzeitinfektionskinetik von Vero E6 3D-Kulturen mit dem attenuierten Gelbfieber-Impfstamm 17D führte zu einer stabilen Replikation der Viren über mehr als sechs Wochen und einer durchgängig höheren Zahl gebildeter viraler Genomäquivalente pro Kultivierungsfläche im Vergleich zur korrespondierenden Monolayer-Kultur. Und auch für zwei verschiedene ZIKA Virus Isolate war es möglich, in den Vero E6 3D-Kulturen über einen längeren Zeitraum auf einem ähnlichen Level wie in Monolayer-Kultur zu replizieren. Für all diese Ansätze müssten aber in Zukunft vertiefende Analysen hinsichtlich der Infektiosität der gebildeten Partikel und vor allem der jeweiligen Wirtszellreaktion auf die Infektion durchgeführt werden, um einen etwaigen Mehrwert der komplexeren Kultivierungsbedingungen zu bestätigen.

Ein weiterer Ansatz für nachfolgende Versuche besteht in der detaillierten Analyse der etablierten nicht-epithelialen 3D-Zellkulturen, die bei ausreichender Ausprägung entsprechender *in vivo* Charakteristika für die Untersuchung von Viren genutzt werden können, die für eine erfolgreiche Infektion nicht nur einen spezifischen Zelltypen sondern auch einen bestimmten Differenzierungsrad der zu infizierenden Zellen benötigen. Diese 3D-Kulturen könnten somit für die physiologische Analyse von bestimmten viralen Eintrittswegen in den Organismus genutzt werden. Ein Beispiel hierfür wäre ein differenziertes 3D-Zellkulturmodell aus primären Endothelzellen für die Infektion mit Viren, die über das Blut aufgenommen werden. Und nicht zuletzt könnte das differenzierte 3D-Zellkulturmodell aus primären humanen Keratinozyten zur - im Vergleich zu epidermalen Raft-Kulturen - vereinfachten, dreidimensionalen Untersuchung von epitheliotropen Viren wie den humanen Papillomviren genutzt werden, wodurch auf einem relativ einfachen Wege Untersuchungen in einem größeren Umfang mit deutlich signifikanterer Aussage ermöglicht würden.

Im Kontext von antiviralen Therapien gegen Pockeninfektionen besteht noch Bedarf in der exakten Aufklärung der differentiellen Wirkeffizienz von Gefitinib in den verschiedenen Zellkulturmodellen und in der Testung verschiedener Therapiesetups. Zudem müsste durch die Verwendung anderer erprobter antiviraler Substanzen geklärt werden, ob die signifikant niedrigere Konzentration von Gefitinib, die im 3D-Ansatz im Vergleich zur Monolayer-Kultur für die Virusinhibition benötigt wird, ein wirkstoff- oder kultivierungsspezifisches Phänomen darstellt. Eine tatsächliche *in vivo*-ähnlichere Reaktion der 3D-Kultur wäre abschließend nur über *in vivo* Experimente zu verifizieren. Davon unabhängig kann das nachgewiesenermaßen *in vivo*-ähnliche Verhalten der 3D-kultivierten Zellen an sich im Infektionskontext für die Identifikation weiterer wirtsgerichteter Zielproteine für antivirale Therapien genutzt werden. Die 3D-Kulturen können somit zur Etablierung von Strategien zur Infektionsbekämpfungen beitragen, die die Bildung von Resistenzen maßgeblich verhindern.

Danksagungen

5. Danksagungen

Diese Arbeit hätte ohne die Hilfe einiger Personen, darunter Kollegen, Familie und Freunde, die mir zu jeder Zeit mit Rat, Tat und Verständnis zur Seite gestanden haben, nicht verfasst werden können.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Betreuer <u>Heinz Ellerbrok</u> für die Möglichkeit bedanken, mich über mehrere Jahre fokussiert meinem Thema widmen zu dürfen, ohne dass ich mich allzu vertieft mit den Fragen der Finanzierung auseinandersetzen musste. Seine Tür sowie mindestens eines seiner Ohren standen mir zu (fast) jeder Zeit offen, sodass ein stetiges Feedback bei neu generierten Ergebnissen oder ausgearbeiteten Plänen möglich war und die Arbeit somit stets sinnvoll vorangetrieben werden konnte.

Ein weiterer großer Dank gilt meinem Mitstreiter <u>Markus Neumann</u>, ohne dessen Unterstützung bei der Planung und Durchführung des Projekts eine Bearbeitung in der hier dargestellten Form nicht möglich gewesen wäre. Zudem war er stets der größte Kritiker aber gleichzeitig auch beste Freund, den man sich am Arbeitsplatz wünschen konnte.

Meinem Diplomanden <u>Georg Hille</u> gilt ein Dank für die geduldige und gewissenhafte Bearbeitung des ihm zugedachten Projekts, durch welches wertvolle Daten für meine Doktorarbeit generiert werden konnten. Meinem Fachgebietsleiter <u>Andreas Nitsche</u> gebührt großer Dank für die Bereitstellung eines sehr gut ausgestatteten Arbeitsplatzes, der keine Wünsche offen ließ und die Bearbeitung meiner Arbeit erheblich vereinfachte. Allen weiteren <u>Mitarbeitern des ZBS1</u> möchte ich zudem für die sehr gute Zusammenarbeit und Atmosphäre danken, die während meiner Zeit hier Normalität war.

Kazimierz Madela, Gudrun Holland, Lars Möller und Michael Laue vom Fachgebiet ZBS4 haben durch ihre Hilfe und geleistete Arbeit am Konfokal- bzw. Elektronenmikroskop signifikanten Anteil an der Qualität dieser Arbeit. Gleiches gilt für <u>Aleksander Radonic</u>, <u>Julia Hinzmann</u>, <u>Berit Haldemann</u> und <u>Wojtek Dabrowski</u>, die mich bei den Transkriptomanalysen sehr unterstützt haben. Und ohne die Bereitstellung der extrazellulären Matrizes durch die Auto Tissue Berlin GmbH in Person von <u>Aila</u> <u>Daugs</u>, <u>Oliver Bloch</u> und dem Geschäftsführer <u>Stefan Seidl</u> wäre die Durchführung des Projektes in dieser Form gar nicht möglich gewesen. All jenen gilt ebenfalls großer Dank.

Der größte Dank geht abschließend an meine Familie, die mich auch in schwierigen Phasen immer wieder aufgefangen und aufgebaut hat. Meine Frau <u>Stephanie</u> und vor allem meine Tochter <u>Emma</u> sind die wichtigsten Personen in meinem Leben, ohne die es häufig nicht möglich gewesen wäre, neue Motivation für die anstehenden Aufgaben zu schöpfen. Und auch meinen Eltern <u>Monika</u> und <u>Jörg</u> sowie meinen <u>Großeltern</u> möchte ich für ihre mentale und finanzielle Unterstützung danken, die mir das Leben vor und während der Promotionszeit erheblich einfacher gemacht haben.

6. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimennsional	HSV	Herpes-simplex-Virus
3D	dreidimensional	HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
AAV	Adeno-assozijertes Virus	IC _{ro}	mittlere inhibitorische Konzentration
ACTR	Reta Actin	IEV	intracellular enveloped virion
Adv	Adopovirus		Immunfluoroszonzassay
AUV	Adenovirus		Immunhistechemie
AIVIP			
aPKC	atypical protein kinase C	ILIRZ	Interleukin-1 receptor type 2
ATCC	american type culture collection	IIGB1	Integrin β-1
ATP	Adenosintriphosphat	kbp	Kilobasenpaare
BCV	Brincidofovir	kDa	Kilodalton
BiNGO	Biological Networks Gene Ontology tool	KGM2	Keratinocyte Growth Medium-2
bp	Basenpaare	ко	Kontrolle
BR	Brighton Red	log	Logarithmus
CALML5	Calmodulin-like protein 5	LPS	Lipopolysaccharid
CASP14	Caspase 14	MAT2A	methionine adenosyltransferase II alpha2
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	MgCl2	Magnesiumchlorid
cDNA	complementary DNA	MMP1	Matrix-Metalloproteasen 1
CDV	Cidofovir	MOI	multiplicity of infection
CEV	cell-associated enveloped virion	MPXV	monkeypox virus
CGF	cowpox arowth factor	mRNA	messenger RNA
CK10	Cytokeratin 10	MV	mature virion
CK14	Cytokeratin 14	NGS	Next-Generation Sequencing
	confocal lasar scanning microscony	NHDE	Normal Human Dormal Eibroblasts
CLOIVI	Conjuction deel scalling incroscopy		Normal Human Enidermal Karatin equites
CIVIC	Carboxymethylcenulose		Normal Human Epidermal Keratinocytes
CPE	cytopathischer Effekt	NOV	Norovirus
СРР	cell penetrating peptide	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A
CPXV	cowpox virus	NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
cT-Wert	threshold cycle	OPV	Orthopockenviren
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	ORF	open reading frame
DDIT3	DNA damage-inducible transcript 3	p.i.	post infectionem
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid	PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	Phosphate-buffered saline
DNase	Desoxyribonuklease	PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	PCR	polymerase chain reaction
DOA	deoxycholic acid	PFA	Paraformaldehyd
DSC1	Desmocollin-1	PFU	plaque-forming unit
FCro	mittlere effektive Wirkkonzentration	PUMA	n53 upregulated modulator of apoptosis
ECGM	Endotholial Call Growth Madium		Polyuinvlidenfluerid
EDTA	Ethylandiamintatraassigsäura		Quality Ascurance
		QA	Quality Assurance
EEV			
EGF	epidermai growth factor	QPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
EGFR	epidermal growth factor receptor	rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsaure
EGFR-P	epidermal growth factor receptor phophorylated	RIN	RNA Integrity Number
ER	Endoplasmatisches Retikulum	RKI	Robert Koch-Institut
EV	enveloped virion	RLU	relative luminescence units
EZM, ECM	extrazelluläre (extracellular) Matrix	RNA	Ribonukleinsäure
FC	fold change	RNase	Ribonuklease
fCPXV	fluorescent cowpox virus	RNASE7	Ribonuklease 7
FDR	false discovery rate	rpm	revolutions per minute
FGF-4	Fibroblast growth factor 4	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	RT	Raumtemperatur
FKS	Fötales Kälberserum	SDS	sodium dodecyl sulfate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
GE	genome equivalents	ТВР	TATA-Box Binding Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
GO	aene ontoloav	UCSC	University of California. Santa Cruz
HCV	Hepatitis-C-Virus	ULAP	Ultra-Low Attachment Plates
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	VACV	Vacciniavirus
HEV	Hepatitis-E-Virus	VARV	Variola-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	VE	Virusfahrik
HPV	Humanes Panillomvirus	VIG	Vaccinia Immune Globulin
HRD	horseradish perovidase	WGA	wheat aerm agalutinin
	Hort chock 70kDa protain 18	700	Zontrum für Biologische Cefebren und Spezielle Betherense
		203	Zentram für biologische Gerähren und Spezielle Pathogene
H2FA	norsepux virus	ZIKV	ZIKd-VITUS

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Endemiegebiete von humanpathogenen Orthopockenviren weltweit	3
Abb. 2: Replikationszyklus von OPV und Ansatzpunkte für antivirale Therapien	5
Abb. 3: Beispiele von epidermalen Kuhpocken-Läsionen in verschiedenen Spezies	7
Abb. 4: Verschiedene 3D-Zellkulturmodelle und deren biologische Komplexität	16
Abb. 5: Beispiel einer zellkulturmodellabhängigen Virusreifung humaner Papillomviren (HPV) in 3D Raft- Kulturen	18
Abb. 6: Dezellularisierung des Perikards und Verwendung der resultierenden extrazellulären Matrix	23
Abb. 7: Präparation von Perikard-basierten 3D-Zellkulturen in Ultra-Low Attachement Plates	33
Abb. 8: Kryoschnittpräparation von 3D-Zellkulturen	44
Abb. 9: Etablierter Workflow für vergleichende Transkriptomanalysen in Partek Flow	48
Abb. 10: Vergleich von dezellularisiertem und nativem equinen Perikardgewebe	52
Abb. 11: Lokalisierung von Basallamina-Komponenten auf dezellularisiertem Perikard	53
Abb. 12: Bindungsneigung des Perikards für Nukleinsäuren und ATP	53
Abb. 13: Repopulation des dezellularisierten Perikards mit verschiedenen Zelltypen	54
Abb. 14: Seitenabhängigkeit des Wachstums von 3D-kultivierten NHEK und Vero E6-Zellen	55
Abb. 15: Expression epithelialer Polarisationsmarker in 3D- und Monolayer-Kultur	56
Abb. 16: Expression von Differenzierungsmarkern in 3D-kultivierten NHEK unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen und in humaner Haut	57
Abb. 17: Zellmorphologie von Vero E6-Zellen in 3D- und Monolayer-Kultur	58
Abb. 18: Langzeitkultivierung von NHEK und Vero E6-Zellen in Perikard-Kultur	59
Abb. 19: Langzeitkultivierung von Vero E6-Zellen in 3D- und Monolayer-Kultur	60
Abb. 20: IHC/IFA-Aufnahmen der CPXV-Ausbreitung in 3D- und Monolayer-kultivierten Vero E6-Zellen über 4 Tage bei niedriger initialer Viruslast	61
Abb. 21: IHC/IFA-Aufnahmen der CPXV-Ausbreitung in 3D- und Monolayer-kultivierten Vero E6-Zellen über 18 Stunden bei hoher initialer Viruslast	62
Abb. 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der CPXV-Reifung in 3D-kultivierten Vero E6-Zellen	63
Abb. 23: Analyse von CPXV-Infektionskinetiken in 3D- und Monolayer-kultivierten Vero E6-Zellen auf Nukleinsäure- und Proteinebene	64
Abb. 24: Nachweis infektiöser Einheiten (PFU) für CPXV-Infektionskinetiken in 3D- und Monolayer- kultivierten Vero E6-Zellen	65
Abb. 25: IHC/IFA-Aufnahmen der CPXV-Ausbreitung in 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK über 4 Tage bei niedriger initialer Viruslast	66
Abb. 26: IHC/IFA-Aufnahmen der CPXV-Ausbreitung in 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK über 18 Stunden bei hoher initialer Viruslast	67
Abb. 27: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der CPXV-Reifung in 3D-kultivierten NHEK	68
Abb. 28: Analyse von CPXV-Infektionskinetiken in 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK auf Nukleinsäure- und Proteinebene	69
Abb. 29: Nachweis infektiöser Einheiten (PFU) für CPXV-Infektionskinetiken in 3D- und Monolayer- kultivierten NHEK	70
Abb. 30: Transkriptomanalyse von CPXV-infizierten 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK bei niedriger initialer Viruslast	74
Abb. 31: GO-Term Analyse der hochregulierten Gene aus der Transkriptomanalyse (CPXV, MOI = 0,01)	75

Abbildungsverzeichnis

Abb.	32: qPCR-Verifizierung der Expression differentiell exprimierter Gene aus der Transkriptomanalyse (CPXV, MOI = 0,01)	76
Abb.	. 33: Verifizierung der CPXV-abhängigen Expression differentiell regulierter Gene aus der Transkriptomanalyse von 3D-NHEK-Kulturen (MOI = 0,01) auf Proteinebene (IHC)	76
Abb.	. 34: Verifizierung der CPXV-abhängigen Expression differentiell regulierter Gene aus der Transkriptomanalyse von 2D-NHEK-Kulturen (MOI = 0,01) auf Proteinebene (IFA)	77
Abb.	35: Transkriptomanalyse von CPXV-infizierten 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK bei hoher initialer Viruslast	78
Abb.	36: GO-Term Analyse der hochregulierten Gene aus der Transkriptomanalyse (CPXV, MOI = 5)	79
Abb.	37: Vergleich der CPXV-abhängigen differentiellen Genexpression in 3D- und Monolayer- kultivierten NHEK aus der Transkriptomanalyse (MOI=5)	80
Abb.	38: Vergleich der Zellkulturmodell-abhängigen Genexpression in uninfizierten NHEK-Präparaten unterschiedlicher Transkriptomanalysen	81
Abb.	39: Vergleich der CPXV-induzierten differentiellen Genexpression von NHEK in den verschiedenen Zellkulturmodellen bei unterschiedlichen Infektionssetups	82
Abb.	40: qPCR-Analyse der mRNA-Expression ausgewählter, differentiell regulierter Gene aus den Transkriptomanalysen von NHEK zu verschiedenen Zeitpunkten	83
Abb.	41: Analyse der Proteinexpression ausgewählter, differentiell regulierter Gene aus der Transkriptomanalyse von NHEK zu verschiedenen Zeitpunkten	84
Abb.	42: qPCR-Analyse der Expression ausgewählter, in NHEK differentiell regulierter Targets in CPXV- infizierten (MOI = 5) und nicht-infizierten Vero-E6 Zellen	85
Abb.	43: Einfluss der Gefitinib-Behandlung von CPXV-infizierten 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK auf die Virusreplikation und die zelluläre sowie virale Genexpression	87
Abb.	44: IFA-Analyse des Einflusses der Gefitinib-Behandlung von CPXV-infizierten Monolayer- kultivierten NHEK auf die Virusverbreitung und die zelluläre Antwort	88
Abb.	45: IHC-Analyse des Einflusses der Gefitinib-Behandlung von CPXV-infizierten 3D-kultivierten NHEK auf die Virusverbreitung und die zelluläre Antwort [200]	89
Abb.	46: Transkriptom- und GO-Term-Analyse von CPXV-infizierten und uninfizierten 3D-kultivierten NHEK und korrespondierender <i>in vitro</i> generierter Haut	91
Abb.	47: Vergleich der am stärksten differentiell exprimierten Gene in Perikard- und Monolayer- kultivierten NHEK und in <i>in vitro</i> generierter Haut während der CPXV-Infektion	92
Abb.	48: Analyse von CPXV-Infektionskinetiken in 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten Vero E6- Zellen auf infektiöse Einheiten (PFU) und auf Nukleinsäureebene	94
Abb.	49: Analyse der Viabilität für CPXV-Infektionskinetiken in 3D-, Monolayer- und Kollagen I- kultivierten Vero E6-Zellen	95
Abb.	50: Analyse von CPXV-Infektionskinetiken in 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten NHEK auf infektiöse Einheiten (PFU) und auf Nukleinsäureebene	95
Abb.	51: qPCR-Analyse der Expression differentiell regulierter Gene aus der Transkriptomanalyse in 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten NHEK in verschiedenen Setups	96
Abb.	52: Analyse der Expression ausgewählter, differentiell regulierter Proteine in CPXV-infizierten 3D-, Monolayer- und Kollagen I-kultivierten NHEK zu verschiedenen Zeitpunkten (MOI=0,01)	97
Abb.	A 1: Differentielle CPXV-Genexpression zwischen 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK bei hoher initialer Viruslast.	146
Abb.	A 2: Differentielle CPXV-Genexpression zwischen 3D-kultivierten NHEK und korrespondierender in	-
	vitro generierter Haut	147

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Limitationen der Monolayer Zellkultivierung in der Virologie	11
Tab. 2: Geräte	25
Tab. 3: Enzyme	25
Tab. 4: Verbrauchsmaterialien	26
Tab. 5: Molekularbiologische Kits	26
Tab. 6: Reagenzien	27
Tab. 7: Interne qPCR-Assays	28
Tab. 8: Kommerzielle qPCR-Assays	28
Tab. 9: Eukaryotische Zellen und Zellkulturmedien	28
Tab. 10: Primäre Antikörper	29
Tab. 11: Sekundäre Antikörper	30
Tab. 12: Software	30
Tab. 13: Puffer und Lösungen	30
Tab. 14: Ansatz für eine konventionelle PCR-Reaktion	39
Tab. 15: Thermoprofil einer PCR-Reaktion	39
Tab. 16: Ansatz für hausinterne qPCRs	40
Tab. 17: Ansatz für TaqMan Gene Expression Assays	40
Tab. 18: Qualität der NGS-Proben und Alignierung der generierten Reads auf das CPXV-Genom	72
Tab. 19: Qualität der NGS-Proben und Alignierung der generierten Reads auf das humane Genom	73

9. Literaturverzeichnis

- 1. King, A.M.Q., Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2012: Elsevier.
- 2. Moss, B., *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*. Fields Virology, 2007. ed. Knipe DM, Howley PM: p. 2905–2946.
- 3. Richman, D.D., R.J. Whitley, and F.G. Hayden, *Clinical Virology, Fourth Edition*. 2017: American Society of Microbiology.
- 4. Seet, B.T., et al., *Poxviruses and immune evasion*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 377-423.
- 5. Upton, C., et al., *Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome.* J Virol, 2003. 77(13): p. 7590-600.
- 6. Koplow, D.A., *Smallpox: The Fight to Eradicate a Global Scourge*. 2003: University of California Press.
- 7. Dixon, C.W., *Smallpox*. 1962: Churchill.
- 8. Riedel, S., *Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2005. 18(1): p. 21-5.
- 9. Sanchez-Sampedro, L., et al., *The evolution of poxvirus vaccines*. Viruses, 2015. 7(4): p. 1726-803.
- 10. Tulman, E.R., et al., *Genome of horsepox virus*. J Virol, 2006. 80(18): p. 9244-58.
- 11. Medaglia, M.L., et al., *Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus.* J Virol, 2015. 89(23): p. 11909-25.
- 12. Bhattacharya, S., *The World Health Organization and global smallpox eradication*. J Epidemiol Community Health, 2008. 62(10): p. 909-12.
- 13. Breman, J.G. and I. Arita, *The confirmation and maintenance of smallpox eradication*. N Engl J Med, 1980. 303(22): p. 1263-73.
- 14. Fenner, F., *Smallpox: emergence, global spread, and eradication.* Hist Philos Life Sci, 1993. 15(3): p. 397-420.
- 15. Berche, P., *The threat of smallpox and bioterrorism*. Trends Microbiol, 2001. 9(1): p. 15-8.
- 16. CDC. *Bioterrorism Agents/Diseases*. 2017 [cited 2017 6 Sep]; Available from: https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp.
- 17. Henderson, D.A., et al., *Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense.* Jama, 1999. 281(22): p. 2127-37.
- 18. Kupferschmidt, K., How Canadian researchers reconstituted an extinct poxvirus for \$100,000 using mail-order DNA. Science, 2017.
- 19. Arita, I., *Smallpox: should we destroy the last stockpile?* Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. 9(10): p. 837-9.
- 20. Jackson, R.J., et al., *Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox.* J Virol, 2001. 75(3): p. 1205-10.
- 21. McCollum, A.M. and I.K. Damon, *Human monkeypox*. Clin Infect Dis, 2014. 58(2): p. 260-7.
- 22. Damle, A.S., et al., *Outbreak of human buffalopox infection*. J Glob Infect Dis, 2011. 3(2): p. 187-8.
- 23. Bera, B.C., et al., *Zoonotic cases of camelpox infection in India*. Vet Microbiol, 2011. 152(1-2): p. 29-38.
- 24. Assis, F.L., et al., *Horizontal study of vaccinia virus infections in an endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects.* Arch Virol, 2015. 160(11): p. 2703-8.
- 25. Vorou, R.M., V.G. Papavassiliou, and I.N. Pierroutsakos, *Cowpox virus infection: an emerging health threat.* Curr Opin Infect Dis, 2008. 21(2): p. 153-6.
- 26. Cudmore, S., et al., Actin-based motility of vaccinia virus. Nature, 1995. 378(6557): p. 636-8.
- 27. Smith, G.L., B.J. Murphy, and M. Law, *Vaccinia virus motility*. Annu Rev Microbiol, 2003. 57: p. 323-42.
- 28. Schmidt, F.I., C.K.E. Bleck, and J. Mercer, *Poxvirus host cell entry*. Current Opinion in Virology, 2012. 2(1): p. 20-27.
- 29. McFadden, G., *Poxvirus tropism*. Nat Rev Microbiol, 2005. 3(3): p. 201-13.
- 30. Tolonen, N., et al., *Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei.* Mol Biol Cell, 2001. 12(7): p. 2031-46.
- 31. Broyles, S.S., *Vaccinia virus transcription*. J Gen Virol, 2003. 84(Pt 9): p. 2293-303.

- 32. Yang, Z., et al., Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(25): p. 11513-8.
- 33. Liu, L., et al., *From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation.* Viruses, 2014. 6(10): p. 3787-808.
- 34. Kroon, E.G., et al., *Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: from field to therapy*. Antiviral Res, 2011. 92(2): p. 150-63.
- 35. Essbauer, S., M. Pfeffer, and H. Meyer, *Zoonotic poxviruses*. Vet Microbiol, 2010. 140(3-4): p. 229-36.
- 36. Baxby, D., M. Bennett, and B. Getty, *Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases.* Br J Dermatol, 1994. 131(5): p. 598-607.
- 37. Pelkonen, P.M., et al., *Cowpox with severe generalized eruption, Finland.* Emerg Infect Dis, 2003. 9(11): p. 1458-61.
- 38. Breithaupt, A., et al., *Clinical course and pathology in rats (Rattus norvegicus) after experimental cowpox virus infection by percutaneous and intranasal application.* Vet Pathol, 2012. 49(6): p. 941-9.
- 39. Carroll, D.S., et al., *Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23086.
- 40. Alzhanova, D. and K. Fruh, *Modulation of the host immune response by cowpox virus*. Microbes Infect, 2010. 12(12-13): p. 900-9.
- 41. Li, Y., et al., On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(40): p. 15787-92.
- 42. Shchelkunov, S.N., An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. PLoS Pathog, 2013. 9(12): p. e1003756.
- 43. Meyer, H., et al., *Characterization of orthopoxviruses isolated from man and animals in Germany*. Arch Virol, 1999. 144(3): p. 491-501.
- 44. Johnson, R.F., et al., Small particle aerosol inoculation of cowpox Brighton Red in rhesus monkeys results in a severe respiratory disease. Virology, 2015. 481: p. 124-35.
- 45. Johnson, M.S., et al., *Survival of a cat with pneumonia due to cowpox virus and feline herpesvirus infection.* J Small Anim Pract, 2009. 50(9): p. 498-502.
- 46. Kurth, A., et al., *Cowpox virus outbreak in banded mongooses (Mungos mungo) and jaguarundis (Herpailurus yagouaroundi) with a time-delayed infection to humans.* PLoS One, 2009. 4(9): p. e6883.
- 47. Gupta, B., T.S. Levchenko, and V.P. Torchilin, *Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. 57(4): p. 637-51.
- 48. Lin, Y.Z., et al., Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. J Biol Chem, 1995. 270(24): p. 14255-8.
- 49. Altmann, S.E., et al., *Inhibition of Vaccinia virus entry by a broad spectrum antiviral peptide*. Virology, 2009. 388(2): p. 248-59.
- 50. Pressman, B.C., *Biological applications of ionophores*. Annu Rev Biochem, 1976. 45: p. 501-30.
- 51. Myskiw, C., et al., *Nigericin is a potent inhibitor of the early stage of vaccinia virus replication*. Antiviral Res, 2010. 88(3): p. 304-10.
- 52. Andrei, G. and R. Snoeck, *Cidofovir Activity against Poxvirus Infections.* Viruses, 2010. 2(12): p. 2803-30.
- 53. De Clercq, E., *Cidofovir in the treatment of poxvirus infections*. Antiviral Res, 2002. 55(1): p. 1-13.
- 54. Ortiz, A., et al., *Tubular cell apoptosis and cidofovir-induced acute renal failure.* Antivir Ther, 2005. 10(1): p. 185-90.
- 55. Smee, D.F., et al., *Characterization of wild-type and cidofovir-resistant strains of camelpox, cowpox, monkeypox, and vaccinia viruses.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(5): p. 1329-35.
- 56. Lanier, R., et al., *Development of CMX001 for the Treatment of Poxvirus Infections.* Viruses, 2010. 2(12): p. 2740-2762.
- 57. Trost, L.C., et al., *The efficacy and pharmacokinetics of brincidofovir for the treatment of lethal rabbitpox virus infection: a model of smallpox disease.* Antiviral Res, 2015. 117: p. 115-21.
- 58. Graci, J.D. and C.E. Cameron, *Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses*. Rev Med Virol, 2006. 16(1): p. 37-48.
- 59. Kesson, A.M., et al., *Progressive vaccinia treated with ribavirin and vaccinia immune globulin*. Clin Infect Dis, 1997. 25(4): p. 911-4.

- 60. Haasnoot, J., E.M. Westerhout, and B. Berkhout, *RNA interference against viruses: strike and counterstrike*. Nat Biotechnol, 2007. 25(12): p. 1435-43.
- 61. McManus, M.T. and P.A. Sharp, *Gene silencing in mammals by small interfering RNAs.* Nat Rev Genet, 2002. 3(10): p. 737-47.
- 62. Dave, R.S., et al., *siRNA targeting vaccinia virus double-stranded RNA binding protein [E3L] exerts potent antiviral effects.* Virology, 2006. 348(2): p. 489-97.
- 63. Vigne, S., et al., Inhibition of vaccinia virus replication by two small interfering RNAs targeting B1R and G7L genes and their synergistic combination with cidofovir. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(6): p. 2579-88.
- 64. Vigne, S., et al., *Specific inhibition of orthopoxvirus replication by a small interfering RNA targeting the D5R gene.* Antivir Ther, 2008. 13(3): p. 357-68.
- 65. Berhanu, A., et al., *ST-246 inhibits in vivo poxvirus dissemination, virus shedding, and systemic disease manifestation.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(12): p. 4999-5009.
- 66. Duraffour, S., et al., Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures. Antiviral Therapy, 2007. 12(8): p. 1205-1216.
- 67. Huggins, J., et al., Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(6): p. 2620-5.
- 68. CDC, *Progressive vaccinia in a military smallpox vaccinee United States, 2009.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2009. 58(19): p. 532-6.
- 69. Vora, S., et al., *Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccinee*. Clin Infect Dis, 2008. 46(10): p. 1555-61.
- 70. Duraffour, S., et al., *ST-246 is a key antiviral to inhibit the viral F13L phospholipase, one of the essential proteins for orthopoxvirus wrapping.* J Antimicrob Chemother, 2015. 70(5): p. 1367-80.
- 71. Yang, G., et al., An orally bioavailable antipoxvirus compound (ST-246) inhibits extracellular virus formation and protects mice from lethal orthopoxvirus Challenge. J Virol, 2005. 79(20): p. 13139-49.
- 72. SIGA. SIGA Completes Enrollment and Dosing in Final Cohort of Phase I Study of IV Formulation of TPOXX[®] (tecovirimat) to Treat Smallpox. 2017 [cited 2017 31 July]; Available from: https://globenewswire.com/news-release/2017/04/20/962566/0/en/SIGA-Completes-Enrollmentand-Dosing-in-Final-Cohort-of-Phase-I-Study-of-IV-Formulation-of-TPOXX-tecovirimat-to-Treat-Smallpox.html.
- 73. Reeves, P.M., et al., *Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases*. Nat Med, 2005. 11(7): p. 731-9.
- 74. Frischknecht, F., et al., *Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling.* Nature, 1999. 401(6756): p. 926-9.
- 75. Barbero, G.J., et al., *Vaccinia gangrenosa treated with hyperimmune vaccinal gamma globulin.* Pediatrics, 1955. 16(5): p. 609-18.
- 76. Bell, E., et al., Antibodies against the extracellular enveloped virus B5R protein are mainly responsible for the EEV neutralizing capacity of vaccinia immune globulin. Virology, 2004. 325(2): p. 425-31.
- 77. Cono, J., C.G. Casey, and D.M. Bell, *Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians.* MMWR Recomm Rep, 2003. 52(Rr-4): p. 1-28.
- 78. Robert-Koch Institut. *Pocken*. 2004 [cited 2017 August 1]; Available from: https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Pocken/Pocken.html.
- 79. Schon, M.P. and M. Schon, *Imiquimod: mode of action.* Br J Dermatol, 2007. 157 Suppl 2: p. 8-13.
- 80. Tarbet, E.B., et al., *Evaluation of imiquimod for topical treatment of vaccinia virus cutaneous infections in immunosuppressed hairless mice.* Antiviral Res, 2011. 90(3): p. 126-33.
- 81. Ara, M., et al., *Giant and recurrent orf virus infection in a renal transplant recipient treated with imiquimod.* J Am Acad Dermatol, 2008. 58(2 Suppl): p. S39-40.
- 82. Lin, H.Y., et al., *An immunocompromised woman with severe molluscum contagiosum that responded well to topical imiquimod: a case report and literature review.* J Low Genit Tract Dis, 2010. 14(2): p. 134-5.
- 83. Jost, M., et al., *Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-xL expression through a MEK-dependent pathway.* J Biol Chem, 2001. 276(9): p. 6320-6.
- 84. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities.* Eur J Cancer, 2001. 37 Suppl 4: p. S3-8.
- 85. Buller, R.M., et al., *Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF*. Virology, 1988. 164(1): p. 182-92.
- 86. Buller, R.M., et al., *Deletion of the vaccinia virus growth factor gene reduces virus virulence*. J Virol, 1988. 62(3): p. 866-74.
- 87. Langhammer, S., et al., *Inhibition of poxvirus spreading by the anti-tumor drug Gefitinib (Iressa)*. Antiviral Res, 2011. 89(1): p. 64-70.
- 88. Lewis, H.W., *Cell Culture and its Application*, in *Cell Culture and its Application*. 1977, Academic Press: San Diego. p. 1-2.
- 89. Norrby, E. and S.B. Prusiner, *Polio and Nobel prizes: looking back 50 years*. Ann Neurol, 2007. 61(5): p. 385-95.
- 90. Hematian, A., et al., *Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis*. Osong Public Health and Research Perspectives, 2016. 7(2): p. 77-82.
- 91. Edmondson, R., et al., *Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors*. Assay Drug Dev Technol, 2014. 12(4): p. 207-18.
- 92. Mazzoleni, G., D. Di Lorenzo, and N. Steimberg, *Modelling tissues in 3D: the next future of pharmacotoxicology and food research?* Genes Nutr, 2009. 4(1): p. 13-22.
- 93. Bhadriraju, K. and C.S. Chen, *Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing.* Drug Discov Today, 2002. 7(11): p. 612-20.
- 94. Breslin, S. and L. O'Driscoll, *Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery*. Drug Discov Today, 2013. 18(5-6): p. 240-9.
- 95. Kola, I., The state of innovation in drug development. Clin Pharmacol Ther, 2008. 83(2): p. 227-30.
- 96. Hutchinson, L. and R. Kirk, *High drug attrition rates--where are we going wrong?* Nat Rev Clin Oncol, 2011. 8(4): p. 189-90.
- 97. Bartenschlager, R., M. Frese, and T. Pietschmann, *Novel Insights into Hepatitis C Virus Replication and Persistence*. Advances in Virus Research, 2004. 63: p. 71-180.
- 98. Duizer, E., et al., Laboratory efforts to cultivate noroviruses. J Gen Virol, 2004. 85(Pt 1): p. 79-87.
- 99. Stubenrauch, F. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus life cycle: active and latent phases.* Semin Cancer Biol, 1999. 9(6): p. 379-86.
- 100. He, B., G. Chen, and Y. Zeng, *Three-dimensional cell culture models for investigating human viruses*. Virol Sin, 2016. 31(5): p. 363-379.
- 101. Ravi, M., et al., *3D cell culture systems: advantages and applications.* J Cell Physiol, 2015. 230(1): p. 16-26.
- 102. Cukierman, E., R. Pankov, and K.M. Yamada, *Cell interactions with three-dimensional matrices*. Curr Opin Cell Biol, 2002. 14(5): p. 633-9.
- 103. Antoni, D., et al., *Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo*. Int J Mol Sci, 2015. 16(3): p. 5517-27.
- 104. Ghosh, S., et al., *Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study.* J Cell Physiol, 2005. 204(2): p. 522-31.
- 105. Kleinman, H.K., et al., *Use of extracellular matrix components for cell culture*. Anal Biochem, 1987. 166(1): p. 1-13.
- 106. PerkinElmer. *Plate Treatments, Coatings and Applications*. 2017 [cited 2017 7 Sep]; Available from: http://www.perkinelmer.de/lab-products-and-services/application-supportknowledgebase/microplates/plate-treatments.html.
- 107. Cooke, M.J., et al., *Enhanced cell attachment using a novel cell culture surface presenting functional domains from extracellular matrix proteins.* Cytotechnology, 2008. 56(2): p. 71-9.
- 108. Gurski, L.A., et al., *3D matrices for anti-cancer drug testing and development*. Oncology Issues, 2010. 25: p. 20-25.
- 109. Stevens, M.M. and J.H. George, *Exploring and engineering the cell surface interface*. Science, 2005. 310(5751): p. 1135-8.
- 110. Curtis, A. and C. Wilkinson, *New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography.* Biochem Soc Symp, 1999. 65: p. 15-26.
- 111. Haycock, J.W., *3D cell culture: a review of current approaches and techniques.* Methods Mol Biol, 2011. 695: p. 1-15.
- 112. Zanoni, M., et al., 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. Sci Rep, 2016. 6: p. 19103.

- 113. Mueller-Klieser, W., J.P. Freyer, and R.M. Sutherland, *Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids.* Br J Cancer, 1986. 53(3): p. 345-53.
- 114. Frieboes, H.B., et al., *An integrated computational/experimental model of tumor invasion.* Cancer Res, 2006. 66(3): p. 1597-604.
- 115. Pampaloni, F., N. Ansari, and E.H. Stelzer, *High-resolution deep imaging of live cellular spheroids with light-sheet-based fluorescence microscopy.* Cell Tissue Res, 2013. 352(1): p. 161-77.
- 116. Ahmed, E.M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review.* Journal of Advanced Research, 2015. 6(2): p. 105-121.
- 117. Dawson, E., et al., *Biomaterials for stem cell differentiation*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. 60(2): p. 215-28.
- 118. Tibbitt, M.W. and K.S. Anseth, *Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture*. Biotechnol Bioeng, 2009. 103(4): p. 655-63.
- 119. Kumar, A.C. and H. Erothu, Synthetic Polymer Hydrogels, in Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites. 2016, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 141-162.
- 120. Bryant, S.J. and K.S. Anseth, *Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels.* J Biomed Mater Res, 2002. 59(1): p. 63-72.
- 121. Zhu, J., *Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering*. Biomaterials, 2010. 31(17): p. 4639-56.
- 122. Maghsoudlou, P., et al., A decellularization methodology for the production of a natural acellular intestinal matrix. J Vis Exp, 2013(80).
- 123. Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science, 2009. 326(5957): p. 1216-9.
- 124. Dominguez-Gimenez, P., N.H. Brown, and M.D. Martin-Bermudo, *Integrin-ECM interactions regulate the changes in cell shape driving the morphogenesis of the Drosophila wing epithelium*. J Cell Sci, 2007. 120(Pt 6): p. 1061-71.
- 125. Methe, K., et al., *An alternative approach to decellularize whole porcine heart.* Biores Open Access, 2014. 3(6): p. 327-38.
- 126. Daley, W.P., S.B. Peters, and M. Larsen, *Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine*. J Cell Sci, 2008. 121(Pt 3): p. 255-64.
- 127. Hoshiba, T., et al., *Decellularized Extracellular Matrix as an In Vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation.* Stem Cells Int, 2016. 2016: p. 6397820.
- 128. Parenteau, N.L., et al., *Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications.* J Cell Biochem, 1991. 45(3): p. 245-51.
- 129. Schoop, V.M., N.E. Fusenig, and N. Mirancea, *Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts*. Journal of Investigative Dermatology, 1999. 112(3): p. 343-353.
- 130. Anacker, D. and C. Moody, *Generation of organotypic raft cultures from primary human keratinocytes.* J Vis Exp, 2012(60).
- 131. Asselineau, D. and M. Prunieras, *Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication.* Br J Dermatol, 1984. 111 Suppl 27: p. 219-22.
- 132. Welss, T., D.A. Basketter, and K.R. Schroder, *In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models.* Toxicol In Vitro, 2004. 18(3): p. 231-43.
- 133. Andrei, G., et al., *Epithelial raft cultures for investigations of virus growth, pathogenesis and efficacy of antiviral agents.* Antiviral Res, 2010. 85(3): p. 431-49.
- 134. Bhatia, S.N. and D.E. Ingber, *Microfluidic organs-on-chips.* Nat Biotechnol, 2014. 32(8): p. 760-72.
- 135. Bhise, N.S., et al., *Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems.* J Control Release, 2014. 190: p. 82-93.
- 136. Villenave, R., et al., *Human Gut-On-A-Chip Supports Polarized Infection of Coxsackie B1 Virus In Vitro.* PLoS One, 2017. 12(2): p. e0169412.
- 137. Wagner, I., et al., *A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture.* Lab Chip, 2013. 13(18): p. 3538-47.
- 138. Maschmeyer, I., et al., *A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents.* Lab Chip, 2015. 15(12): p. 2688-99.
- 139. Esch, E.W., A. Bahinski, and D. Huh, *Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2015. 14(4): p. 248-60.
- 140. Harvard Magazine. *Organs-on-a-chip*. 2016 [cited 2017 11. Mai]; Available from: http://harvardmagazine.com/2015/12/mimicking-organs.

- 141. Izadifar, Z., X. Chen, and W. Kulyk, *Strategic design and fabrication of engineered scaffolds for articular cartilage repair.* J Funct Biomater, 2012. 3(4): p. 799-838.
- 142. Stark, H.J., et al., Organotypic cocultures as skin equivalents: A complex and sophisticated in vitro system. Biol Proced Online, 2004. 6: p. 55-60.
- 143. Viscofan. *Kollagen Membran*. 2017 [cited 2017 11. Mai]; Available from: http://www.labvolution.de/product/collagen-cell-carrier-ccc/1892917/T932710.
- 144. Zujur, D., et al., *Three-dimensional system enabling the maintenance and directed differentiation of pluripotent stem cells under defined conditions.* Sci Adv, 2017. 3(5): p. e1602875.
- 145. Ravi, M., A. Ramesh, and A. Pattabhi, *Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research*. J Cell Physiol, 2017. 232(10): p. 2679-2697.
- 146. Fang, Y. and R.M. Eglen, *Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development.* SLAS Discov, 2017. 22(5): p. 456-472.
- 147. Carletti, E., A. Motta, and C. Migliaresi, *Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture*. Methods Mol Biol, 2011. 695: p. 17-39.
- 148. Bernard, H.U., et al., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.* Virology, 2010. 401(1): p. 70-9.
- 149. Graham, S.V., *Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies.* Future Microbiol, 2010. 5(10): p. 1493-506.
- 150. Dollard, S.C., et al., *Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. OFF.* Genes Dev, 1992. 6(7): p. 1131-42.
- 151. Satsuka, A., et al., Novel human papillomavirus type 18 replicon and its application in screening the antiviral effects of cytokines. Cancer Sci, 2010. 101(2): p. 536-42.
- 152. Meyers, C., S.S. Andreansky, and R.J. Courtney, *Replication and interaction of herpes simplex virus and human papillomavirus in differentiating host epithelial tissue.* Virology, 2003. 315(1): p. 43-55.
- 153. Doorbar, J., *Model systems of human papillomavirus-associated disease.* J Pathol, 2016. 238(2): p. 166-79.
- 154. Lowy, D.R. and J.T. Schiller, *Prophylactic human papillomavirus vaccines*. J Clin Invest, 2006. 116(5): p. 1167-73.
- 155. Balkhy, H.H., C. Sabella, and J. Goldfarb, *Parvovirus: a review*. Bull Rheum Dis, 1998. 47(3): p. 4-9.
- 156. Weitzman, M.D. and R.M. Linden, *Adeno-associated virus biology*, in *Adeno-Associated Virus*. 2011. p. 1-23.
- 157. Boutin, S., et al., *Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus* (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. Hum Gene Ther, 2010. 21(6): p. 704-12.
- 158. Meyers, C., et al., Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. Virology, 2000. 272(2): p. 338-46.
- 159. Doceul, V., et al., Zoonotic Hepatitis E Virus: Classi fi cation, Animal Reservoirs and Transmission Routes. Viruses, 2016. 8(10).
- 160. Li, S.W., et al., *The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239*. Hum Vaccin Immunother, 2015. 11(4): p. 908-14.
- 161. Osterman, A., et al., *The Hepatitis E virus intraviral interactome*. Sci Rep, 2015. 5: p. 13872.
- 162. Berto, A., et al., *Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture.* J Virol Methods, 2013. 187(2): p. 327-32.
- 163. Robilotti, E., S. Deresinski, and B.A. Pinsky, *Norovirus*. Clin Microbiol Rev, 2015. 28(1): p. 134-64.
- 164. Robinson, C.M. and J.K. Pfeiffer, *Virology. Leaping the norovirus hurdle*. Science, 2014. 346(6210): p. 700-1.
- 165. Straub, T.M., et al., *Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure.* J Water Health, 2011. 9(2): p. 225-40.
- 166. Straub, T.M., et al., *In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses*. Emerg Infect Dis, 2007. 13(3): p. 396-403.
- 167. Papafragkou, E., et al., *Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture models.* PLoS One, 2014. 8(6): p. e63485.
- 168. Duraffour, S., et al., Activities of several classes of acyclic nucleoside phosphonates against camelpox virus replication in different cell culture models. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007. 51(12): p. 4410-4419.

- 169. Tamosiunaite, A., et al., *Histopathological and Immunohistochemical Studies of Cowpox Virus Replication in a Three-Dimensional Skin Model.* J Comp Pathol, 2016. 155(1): p. 55-61.
- 170. Israr, M., et al., *Effect of the HIV protease inhibitor amprenavir on the growth and differentiation of primary gingival epithelium*. Antivir Ther, 2010. 15(2): p. 253-65.
- 171. Israr, M., et al., *The HIV protease inhibitor lopinavir/ritonavir (Kaletra) alters the growth, differentiation and proliferation of primary gingival epithelium.* HIV Med, 2011. 12(3): p. 145-56.
- 172. Mitchell, D., et al., *HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitors efavirenz and tenofovir change the growth and differentiation of primary gingival epithelium.* HIV Med, 2014. 15(4): p. 196-202.
- 173. Mitchell, D., et al., *Effect of the HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitor zidovudine on the growth and differentiation of primary gingival epithelium.* HIV Med, 2012. 13(5): p. 276-90.
- 174. Nickerson, C.A., E.G. Richter, and C.M. Ott, *Studying host-pathogen interactions in 3-D: organotypic models for infectious disease and drug development.* J Neuroimmune Pharmacol, 2007. 2(1): p. 26-31.
- 175. Aly, H.H., K. Shimotohno, and M. Hijikata, *3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 379(2): p. 330-4.
- 176. Murakami, K., et al., *Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b.* Virology, 2006. 351(2): p. 381-392.
- 177. Sainz, B., Jr., V. TenCate, and S.L. Uprichard, *Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study* of Hepatitis C virus infection. Virol J, 2009. 6: p. 103.
- 178. Syrjanen, S., et al., *In vitro establishment of lytic and nonproductive infection by herpes simplex virus type 1 in three-dimensional keratinocyte culture*. J Virol, 1996. 70(9): p. 6524-8.
- 179. Andrei, G., et al., Organotypic epithelial raft cultures as a model for evaluating compounds against alphaherpesviruses. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005. 49(11): p. 4671-4680.
- Young, L.S. and V. Mautner, *The promise and potential hazards of adenovirus gene therapy*. Gut, 2001.
 48(5): p. 733-6.
- 181. Grill, J., et al., *The organotypic multicellular spheroid is a relevant three-dimensional model to study adenovirus replication and penetration in human tumors in vitro.* Mol Ther, 2002. 6(5): p. 609-14.
- 182. Noya, F., et al., Activation of adenovirus early promoters and lytic phase in differentiated strata of organotypic cultures of human keratinocytes. J Virol, 2003. 77(11): p. 6533-40.
- 183. Wang, N., et al., Adenovirus-mediated efficient gene transfer into cultured three-dimensional organoids. PLoS One, 2014. 9(4): p. e93608.
- 184. Qian, X., et al., *Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure.* Cell, 2016. 165(5): p. 1238-54.
- 185. Watkins, M.W. and M.M. LeWinter, *Physiologic role of the normal pericardium*. Annu Rev Med, 1993.
 44: p. 171-80.
- 186. Bloch, O., et al., *Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves.* Med Sci Monit, 2012. 18(12): p. Br487-92.
- 187. Auto Tissue Berlin GmbH. *Matrix Patch equiner Perikardpatch*. 2013 [cited 2017 Sep 8]; Available from: http://www.autotissue.de/fileadmin/user_upload/Bilder_Patch/IFU_MatrixPatch_deutsch_.pdf.
- 188. Auto Tissue Berlin GmbH. *Matrix Patch*. 2017 [cited 2017 Sep 8]; Available from: http://www.autotissue.de/seknavi/patche/?L=%2Fproc%2Fself%2Fenviron%23%23%23%23%23.
- 189. Auto Tissue Berlin GmbH. *Matrix Patch™*. 2015 [cited 2017 Sep 8]; Available from: http://www.autotissue.de/uploads/media/Produktblatt_Patch_Gefaesschirurgie_DE_03.pdf.
- 190. Dohmen, P.M., et al., *Successful implantation of a decellularized equine pericardial patch into the systemic circulation.* Med Sci Monit Basic Res, 2014. 20: p. 1-8.
- 191. Auto Tissue Berlin GmbH. *Perikard Dezellularisierung*. 2017 [cited 2017 11. Mai]; Available from: http://www.autotissue.de/seknavi/dezellularisierung/.
- 192. Vagnerova, R. *Lokalisation Perikard*. 2015 [cited 2017 11. Mai]; Available from: http://kardioblogie.blogspot.de/2013/08/echo-2-echo-v-kostce-perikardialni.html.
- 193. Roth, S.J., et al., *Recovery of infectious virus from full-length cowpox virus (CPXV) DNA cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC).* Vet Res, 2011. 42: p. 3.
- 194. Koressaar, T. and M. Remm, *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*. Bioinformatics, 2007. 23(10): p. 1289-91.
- 195. Wisniewski, J.R. and F.Z. Gaugaz, *Fast and sensitive total protein and Peptide assays for proteomic analysis*. Anal Chem, 2015. 87(8): p. 4110-6.

- 196. Jonkman, J. and C.M. Brown, *Any Way You Slice It-A Comparison of Confocal Microscopy Techniques*. J Biomol Tech, 2015. 26(2): p. 54-65.
- 197. Laue, M., *Electron microscopy of viruses*. Methods Cell Biol, 2010. 96: p. 1-20.
- 198. Maere, S., K. Heymans, and M. Kuiper, *BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks.* Bioinformatics, 2005. 21(16): p. 3448-9.
- 199. Hille, G., *Diplomarbeit Charakterisierung eines EZM-basierten Infektionsmodells.* Technische Universität Berlin, 2017.
- 200. Koban, R., et al., *A novel three-dimensional cell culture method enhances antiviral drug screening in primary human cells.* Antiviral Research, 2017: submitted for publication.
- 201. Neumann, M., Dissertation Etablierung eines dreidimensionalen Infektionsmodells für Kuhpockenviren in humaner Haut und Charakterisierung der Infektion. Technische Universität Berlin, 2017.
- 202. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function.* Acta Biomater, 2009. 5(1): p. 1-13.
- 203. Kular, J.K., S. Basu, and R.I. Sharma, *The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering.* J Tissue Eng, 2014. 5: p. 2041731414557112.
- 204. Abbott, A., Cell culture: biology's new dimension. Nature, 2003. 424(6951): p. 870-2.
- 205. Lee, J., M.J. Cuddihy, and N.A. Kotov, *Three-dimensional cell culture matrices: state of the art.* Tissue Eng Part B Rev, 2008. 14(1): p. 61-86.
- 206. Bissell, M.J., P.A. Kenny, and D.C. Radisky, *Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005. 70: p. 343-56.
- 207. Zhang, S., *Beyond the Petri dish*. Nat Biotechnol, 2004. 22(2): p. 151-2.
- 208. van Velzen, S.K.T. and A. van den Hooff, *Long-term results of the implantation of glutaraldehyde-fixed tissue.* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1977. 44(5): p. 792-798.
- 209. Umashankar, P.R., P.V. Mohanan, and T.V. Kumari, *Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium.* Toxicol Int, 2012. 19(1): p. 51-8.
- 210. Lee, P., et al., *Microfluidic alignment of collagen fibers for in vitro cell culture.* Biomed Microdevices, 2006. 8(1): p. 35-41.
- 211. Sherbet, G.V., *Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy*. 2011: Elsevier.
- 212. Gupta, P.K., Cell and Molecular Biology. 2009: Rastogi Publications.
- 213. Andrei, G., et al., Organotypic epithelial raft cultures as a model for evaluating compounds against alphaherpesviruses. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(11): p. 4671-80.
- 214. Gupta, N., et al., *Microfluidics-based 3D cell culture models: Utility in novel drug discovery and delivery research.* Bioengineering & Translational Medicine, 2016. 1(1): p. 63-81.
- 215. Zhang, Q., Y. Yu, and H. Zhao, *The effect of matrix stiffness on biomechanical properties of chondrocytes*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2016. 48(10): p. 958-965.
- 216. Pillai, S., et al., *Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium.* J Cell Physiol, 1990. 143(2): p. 294-302.
- 217. McGrath, J.A. and J. Uitto, Anatomy and Organization of Human Skin, in Rook's Textbook of Dermatology. 2010, Wiley-Blackwell. p. 1-53.
- 218. Baker, B.M. and C.S. Chen, *Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues.* J Cell Sci, 2012. 125(Pt 13): p. 3015-24.
- 219. Inman, J.L. and M.J. Bissell, *Apical polarity in three-dimensional culture systems: where to now?* J Biol, 2010. 9(1): p. 2.
- Weaver, V.M., et al., beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. Cancer Cell, 2002. 2(3): p. 205-16.
- 221. Yu, T., et al., *Kruppel-like factor 4 regulates intestinal epithelial cell morphology and polarity.* PLoS One, 2012. 7(2): p. e32492.
- 222. Rodriguez-Boulan, E. and I.G. Macara, *Organization and execution of the epithelial polarity programme.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. 15(4): p. 225-42.

- 223. Izumi, Y., et al., An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-3. J Cell Biol, 1998. 143(1): p. 95-106.
- 224. De Luca, M., et al., *Polarized integrin mediates human keratinocyte adhesion to basal lamina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(17): p. 6888-92.
- 225. Izmailyan, R., et al., Integrin beta1 mediates vaccinia virus entry through activation of PI3K/Akt signaling. J Virol, 2012. 86(12): p. 6677-87.
- 226. Wrzesinski, K., et al., *HepG2/C3A 3D spheroids exhibit stable physiological functionality for at least 24 days after recovering from trypsinisation.* Toxicology Research, 2013. 2(3): p. 163-172.
- 227. Li, S., et al., *Genomic analysis of smooth muscle cells in 3-dimensional collagen matrix*. Faseb j, 2003. 17(1): p. 97-9.
- 228. Xu, T., et al., *Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel.* Biomaterials, 2009. 30(26): p. 4377-83.
- 229. Chen, C., K. Chen, and S.T. Yang, *Effects of three-dimensional culturing on osteosarcoma cells grown in a fibrous matrix: analyses of cell morphology, cell cycle, and apoptosis.* Biotechnol Prog, 2003. 19(5): p. 1574-82.
- 230. Park, C.C., et al., *Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo.* Cancer Res, 2006. 66(3): p. 1526-35.
- 231. Heenen, M., et al., *Ki-67 immunostaining of normal human epidermis: comparison with 3H-thymidine labelling and PCNA immunostaining.* Dermatology, 1998. 197(2): p. 123-6.
- 232. Barnhill, R.L. and J.E. Wolf, *Angiogenesis and the skin.* Journal of the American Academy of Dermatology, 1987. 16(6): p. 1226-1242.
- 233. Bangert, C., P.M. Brunner, and G. Stingl, *Immune functions of the skin*. Clin Dermatol, 2011. 29(4): p. 360-76.
- 234. Abtin, A., et al., *Degradation by stratum corneum proteases prevents endogenous RNase inhibitor from blocking antimicrobial activities of RNase 5 and RNase 7.* J Invest Dermatol, 2009. 129(9): p. 2193-201.
- 235. Bergeron, L., et al., *Skin presenting a higher level of caspase-14 is better protected from UVB irradiation according to in vitro and in vivo studies.* J Cosmet Dermatol, 2012. 11(2): p. 111-21.
- 236. King, I.A., T.J. O'Brien, and R.S. Buxton, *Expression of the "skin-type" desmosomal cadherin DSC1 is closely linked to the keratinization of epithelial tissues during mouse development.* J Invest Dermatol, 1996. 107(4): p. 531-8.
- 237. Méhul, B., D. Bernard, and R. Schmidt, *Calmodulin-Like Skin Protein: A New Marker of Keratinocyte Differentiation.* Journal of Investigative Dermatology, 2001. 116(6): p. 905-909.
- 238. Rauschmayr, T., R.W. Groves, and T.S. Kupper, *Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(11): p. 5814-9.
- 239. Zhang, J., K.D. Dyer, and H.F. Rosenberg, *Human RNase 7: a new cationic ribonuclease of the RNase A superfamily.* Nucleic Acids Res, 2003. 31(2): p. 602-7.
- 240. Becknell, B. and J.D. Spencer, A Review of Ribonuclease 7's Structure, Regulation, and Contributions to Host Defense. Int J Mol Sci, 2016. 17(3): p. 423.
- 241. Koten, B., et al., *RNase 7 contributes to the cutaneous defense against Enterococcus faecium*. PLoS One, 2009. 4(7): p. e6424.
- 242. Coulombe, P.A., R. Kopan, and E. Fuchs, *Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation.* J Cell Biol, 1989. 109(5): p. 2295-312.
- 243. Murphy, G.F., et al., *Involucrin expression in normal and neoplastic human skin: a marker for keratinocyte differentiation.* J Invest Dermatol, 1984. 82(5): p. 453-7.
- 244. Rieger, M. and W.W. Franke, *Identification of an orthologous mammalian cytokeratin gene. High degree of intron sequence conservation during evolution of human cytokeratin 10.* J Mol Biol, 1988. 204(4): p. 841-56.
- 245. Andrei, G., *Three-dimensional culture models for human viral diseases and antiviral drug development.* Antiviral Research, 2006. 71(2-3): p. 96-107.
- 246. Drummond, C.G., C.A. Nickerson, and C.B. Coyne, A Three-Dimensional Cell Culture Model To Study Enterovirus Infection of Polarized Intestinal Epithelial Cells. mSphere, 2016. 1(1).

- 247. El Assal, R., et al., *3-D Microwell Array System for Culturing Virus Infected Tumor Cells*. Sci Rep, 2016. 6: p. 39144.
- 248. Snoeck, R., et al., *Antivaccinia activities of acyclic nucleoside phosphonate derivatives in epithelial cells and organotypic cultures.* Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(11): p. 3356-61.
- 249. Graf, B.W. and S.A. Boppart, *Imaging and analysis of three-dimensional cell culture models*. Methods Mol Biol, 2010. 591: p. 211-27.
- 250. Kato, T., et al., *Cell culture and infection system for hepatitis C virus*. Nat Protoc, 2006. 1(5): p. 2334-9.
- 251. Pickup, D.J., *Extracellular Virions: The Advance Guard of Poxvirus Infections*. PLoS Pathog, 2015. 11(7): p. e1004904.
- 252. Payne, L.G., *The existence of an envelope on extracellular cowpox virus and its antigenic relationship to the vaccinia envelope.* Arch Virol, 1986. 90(1-2): p. 125-33.
- 253. Moss, B., *Poxvirus cell entry: how many proteins does it take?* Viruses, 2012. 4(5): p. 688-707.
- 254. Roper, R.L., et al., *The envelope protein encoded by the A33R gene is required for formation of actincontaining microvilli and efficient cell-to-cell spread of vaccinia virus.* J Virol, 1998. 72(5): p. 4192-204.
- 255. Modrow, S., Viren: Grundlagen, Krankheiten, Therapien. 2001: Beck.
- 256. Herder, V., et al., *Poxvirus infection in a cat with presumptive human transmission*. Vet Dermatol, 2011. 22(2): p. 220-4.
- 257. Johnson, R.F., et al., *Cowpox virus infection of cynomolgus macaques as a model of hemorrhagic smallpox.* Virology, 2011. 418(2): p. 102-12.
- 258. Bragulla, H.H. and D.G. Homberger, *Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia.* J Anat, 2009. 214(4): p. 516-59.
- 259. Cooray, S., *The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival.* J Gen Virol, 2004. 85(Pt 5): p. 1065-76.
- 260. Soares, J.A., et al., Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication. J Virol, 2009. 83(13): p. 6883-99.
- 261. Liang, C., B.H. Oh, and J.U. Jung, *Novel functions of viral anti-apoptotic factors*. Nat Rev Microbiol, 2015. 13(1): p. 7-12.
- 262. Shchelkunov, S.N., S.S. Marennikova, and R.W. Moyer, *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. 2005: Springer US.
- 263. de Roode, J.C., A.J. Yates, and S. Altizer, *Virulence-transmission trade-offs and population divergence in virulence in a naturally occurring butterfly parasite.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(21): p. 7489-94.
- 264. Bourquain, D., P.W. Dabrowski, and A. Nitsche, *Comparison of host cell gene expression in cowpox, monkeypox or vaccinia virus-infected cells reveals virus-specific regulation of immune response genes.* Virol J, 2013. 10: p. 61.
- 265. Brum, L.M., et al., *Microarray analysis of A549 cells infected with rabbitpox virus (RPV): a comparison of wild-type RPV and RPV deleted for the host range gene, SPI-1.* Virology, 2003. 315(2): p. 322-34.
- 266. Rubins, K.H., et al., *Stunned silence: gene expression programs in human cells infected with monkeypox or vaccinia virus.* PLoS One, 2011. 6(1): p. e15615.
- 267. Mazzon, M. and J. Mercer, *Lipid interactions during virus entry and infection*. Cell Microbiol, 2014. 16(10): p. 1493-502.
- 268. Muralidharan, S. and P. Mandrekar, *Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation.* J Leukoc Biol, 2013. 94(6): p. 1167-84.
- 269. Kotwal, G.J., S. Hatch, and W.L. Marshall, *Viral infection: an evolving insight into the signal transduction pathways responsible for the innate immune response.* Adv Virol, 2012. 2012: p. 131457.
- 270. Bourquain, D. and A. Nitsche, *Cowpox virus but not Vaccinia virus induces secretion of CXCL1, IL-8 and IL-6 and chemotaxis of monocytes in vitro.* Virus Res, 2013. 171(1): p. 161-7.
- 271. Modrow, S., et al., *Viral Proliferation and Replication*, in *Molecular Virology*. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 31-38.
- 272. Hollinshead, M., et al., *Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface*. J Cell Biol, 2001. 154(2): p. 389-402.
- 273. Ploubidou, A., et al., *Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function.* Embo j, 2000. 19(15): p. 3932-44.
- 274. Ward, B.M. and B. Moss, Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. J Virol, 2001. 75(23): p. 11651-63.

- 275. Hynes, N.E., et al., *Signalling change: signal transduction through the decades.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. 14(6): p. 393-398.
- 276. Bagga, S. and M.J. Bouchard, *Cell cycle regulation during viral infection*. Methods Mol Biol, 2014. 1170: p. 165-227.
- 277. Duraffour, S., et al., *Emergence of cowpox: study of the virulence of clinical strains and evaluation of antivirals.* PLoS One, 2013. 8(2): p. e55808.
- 278. Liu, M., et al., *CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications.* Cytokine Growth Factor Rev, 2011. 22(3): p. 121-30.
- 279. Peters, N.E., et al., A mechanism for the inhibition of DNA-PK-mediated DNA sensing by a virus. PLoS Pathog, 2013. 9(10): p. e1003649.
- 280. Jindal, S. and R.A. Young, *Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of Hsp70 with viral proteins.* J Virol, 1992. 66(9): p. 5357-62.
- 281. Sedger, L. and J. Ruby, *Heat shock response to vaccinia virus infection*. J Virol, 1994. 68(7): p. 4685-9.
- 282. da Fonseca, F.G., et al., *The genome of cowpox virus contains a gene related to those encoding the epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor.* Virus Genes, 1999. 18(2): p. 151-60.
- 283. Lundberg, E., et al., *Defining the transcriptome and proteome in three functionally different human cell lines.* Mol Syst Biol, 2010. 6: p. 450.
- 284. Pertea, M., *The human transcriptome: an unfinished story*. Genes (Basel), 2012. 3(3): p. 344-60.
- 285. Schwanhausser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control.* Nature, 2011. 473(7347): p. 337-42.
- 286. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses.* Nat Rev Genet, 2012. 13(4): p. 227-32.
- 287. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.* Cell, 2009. 136(2): p. 215-33.
- 288. Denecker, G., et al., *Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss*. Nat Cell Biol, 2007. 9(6): p. 666-74.
- 289. Murakami, H., et al., *Association of caspase-14 and filaggrin expression with keratinization of the oral mucosa and reconstruction culture rat models.* J Periodontal Res, 2014. 49(6): p. 703-10.
- 290. Kim, M.Y. and M. Oglesbee, *Virus-heat shock protein interaction and a novel axis for innate antiviral immunity*. Cells, 2012. 1(3): p. 646-66.
- 291. Lahaye, X., et al., *Hsp70 protein positively regulates rabies virus infection*. J Virol, 2012. 86(9): p. 4743-51.
- 292. Mayer, M.P., *Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies.* Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2005. 153: p. 1-46.
- 293. Attar, N., Viral infection: De-chaperoning antivirals. Nat Rev Microbiol, 2016. 14(1): p. 2.
- 294. Gao, J., et al., Inhibition of HSP70 reduces porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in vitro. BMC Microbiol, 2014. 14: p. 64.
- 295. McMahan, C.J., et al., A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. Embo j, 1991. 10(10): p. 2821-32.
- 296. Gabellec, M.M., et al., Interleukin-1 receptors type I and type II in the mouse brain: kinetics of mRNA expressions after peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. J Neuroimmunol, 1996. 66(1-2): p. 65-70.
- 297. Spriggs, M.K., et al., Vaccinia and cowpox viruses encode a novel secreted interleukin-1-binding protein. Cell, 1992. 71(1): p. 145-52.
- 298. Peters, V.A., J.J. Joesting, and G.G. Freund, *IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation*. Brain Behav Immun, 2013. 32: p. 1-8.
- 299. Zheng, Y., et al., Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1alpha, controlling necrosis-induced sterile inflammation. Immunity, 2013. 38(2): p. 285-95.
- 300. Limb, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase-1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis.* Am J Pathol, 2005. 166(5): p. 1555-63.
- 301. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1999. 274(31): p. 21491-4.
- 302. Dumin, J.A., et al., *Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen.* J Biol Chem, 2001. 276(31): p. 29368-74.
- 303. Elkington, P.T., C.M. O'Kane, and J.S. Friedland, *The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease*. Clin Exp Immunol, 2005. 142(1): p. 12-20.

- 304. McQuibban, G.A., et al., *Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo.* Blood, 2002. 100(4): p. 1160-7.
- 305. Ito, A., et al., *Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases.* J Biol Chem, 1996. 271(25): p. 14657-60.
- 306. Paul, R., et al., *Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis.* Ann Neurol, 1998. 44(4): p. 592-600.
- 307. Liechti, F.D., et al., *The matrix metalloproteinase inhibitor RS-130830 attenuates brain injury in experimental pneumococcal meningitis.* J Neuroinflammation, 2015. 12: p. 43.
- 308. Whittaker, M., et al., *Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors.* Chem Rev, 1999. 99(9): p. 2735-76.
- 309. Zhao, Y. and D. Bruemmer, *NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. 30(8): p. 1535-41.
- 310. Li, H., et al., *Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3.* Science, 2000. 289(5482): p. 1159-64.
- 311. Pei, L., A. Castrillo, and P. Tontonoz, *Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77.* Mol Endocrinol, 2006. 20(4): p. 786-94.
- 312. Hamers, A.A., et al., *Limited role of nuclear receptor Nur77 in Escherichia coli-induced peritonitis*. Infect Immun, 2014. 82(1): p. 253-64.
- 313. Cohen, M.H., et al., United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. Clin Cancer Res, 2004. 10(4): p. 1212-8.
- 314. Lebeau, I., et al., Activities of alkoxyalkyl esters of cidofovir (CDV), cyclic CDV, and (S)-9-(3-hydroxy-2phosphonylmethoxypropyl)adenine against orthopoxviruses in cell monolayers and in organotypic cultures. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(7): p. 2525-9.
- 315. Luca, A.C., et al., Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. PLoS One, 2013. 8(3): p. e59689.
- 316. Zumla, A., et al., *Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects.* Lancet Infect Dis, 2016. 16(4): p. e47-63.

10. Appendix

differentielle CPXV Genexpression											
<u>3D 4 h vs. 2D 4 h</u>				<u>3D 8 h vs. 2D 8 h</u>							
Hochregulierte Gene	FDR	FC		Hochregulierte Gene	FDR	FC					
CPXV203 CDS	1.8E-10	2.0		CPXV082 CDS	3.0E-60	5.9					
				CPXV071 CDS	3.9E-41	5.6					
Herunterregulierte Gene	FDR	FC		CPXV040 CDS	2.4E-56	5.5					
CPXV145 CDS	1.2E-02	-2.8		CrmA	7.7E-42	5.0					
CPXV229 CDS	4.7E-02	-2.8		CPXV049 CDS	1.8E-58	4.9					
CPXV165 CDS	1.3E-09	-2.8		CPXV025 CDS	1.6E-43	4.9					
CPXV146 CDS	1.4E-03	-2.7		CPXV069 CDS	7.2E-46	4.7					
CPXV149 CDS	1.5E-04	-2.6		CPXV048 CDS	1.1E-61	4.5					
CPXV183 CDS	9.5E-08	-2.6		CPXV081 CDS	2.3E-33	4.3					
CPXV142 CDS	3.4E-07	-2.5		CPXV047 CDS	2.7E-16	4.0					
CPXV110 CDS	5.7E-09	-2.5		CPXV202 CDS	1.1E-46	3.7					
CPXV133 CDS	6.1E-09	-2.5		CPXV219 CDS	7.7E-42	3.6					
CPX139 CDS	7.4E-13	-2.4		CPXV189 CDS	3.8E-43	3.6					
CPXV087 CDS	3.8E-18	-2.4		CPXV208 CDS	1.4E-21	3.6					
CPXV134 CDS	5.2E-03	-2.3		CPXV038 CDS	9.3E-32	3.5					
CPXV014 CDS	6.6E-04	-2.3		CPXV212 CDS	2.2E-52	3.5					
CPXV104 CDS	3.2E-09	-2.3		CPXV065 CDS	8.0E-80	3.1					
CPXV144 CDS	1.4E-05	-2.3		VGF	4.4E-29	3.1					
CPXV169 CDS	2.9E-04	-2.3		CPXV186 CDS	2.7E-22	3.1					
CPXV112 CDS	3.0E-05	-2.2		CPXV024 CDS	7.2E-33	2.9					
CPXV086 CDS	7.9E-10	-2.2		CPXV070 CDS	1.4E-28	2.9					
CPXV023 CDS	1.4E-25	-2.2		CPXV100 CDS	8.6E-22	2.8					
CPXV097 CDS	1.9E-17	-2.2		CPXV218 CDS	5.6E-34	2.7					
CPXV167 CDS	1.3E-13	-2.2		CPXV062 CDS	1.3E-33	2.6					
CPXV120 CDS	1.6E-15	-2.2		CPXV012 CDS	4.4E-31	2.5					
CPV125 CDS	6.5E-07	-2.2		CPXV203 CDS	3.7E-16	2.5					
CPXV130 CDS	7.7E-08	-2.2		CPXV058 CDS	6.3E-27	2.4					
CPXV094 CDS	5.1E-14	-2.2		CPXV205 CDS	1.6E-20	2.4					
CPXV143 CDS	2.5E-06	-2.2		CPXV059 CDS	3.4E-25	2.4					
CPXV161 CDS	6.7E-09	-2.2		CPXV220 CDS	5.7E-61	2.3					
CPXV176 CDS	8.2E-21	-2.2		crmB	1.3E-21	2.3					
CPXV162 CDS	6.5E-04	-2.2		CPXV184 CDS	6.2E-24	2.2					
CPXV210 CDS	5.1E-11	-2.1		CPXV045 CDS	8.4E-27	2.2					
CPXV132 CDS	1.2E-15	-2.1		CPXV206 CDS	5.6E-40	2.1					
CPXV138 CDS	1.2E-17	-2.1		CPXV213 CDS	5.3E-44	2.1					
CPXV131 CDS	4.0E-12	-2.1		CPXV156 CDS	5.6E-29	2.1					
CPXV117 CDS	1.1E-37	-2.1		CPXV019 CDS	3.1E-65	2.1					
CPXV076 CDS	3.4E-07	-2.1		CPXV197 CDS	9.4E-21	2.1					
CPXV080 CDS	1.5E-17	-2.1		CPXV114 CDS	1.5E-22	2.0					
CPXV198 CDS	1.8E-05	-2.1									
CPXV073 CDS	2.1E-19	-2.1		Herunterregulierte Gene	FDR	FC					
CrmC	1.3E-07	-2.0		CPXV146 CDS	6.5E-03	-2.0					
CPXV028 CDS	5.5E-15	-2.0									
CPXV113 CDS	1.2E-10	-2.0		frühe Genexpression							
CPXV102 CDS	4.3E-08	-2.0		intermediäre/späte Genexpression							
CPXV079 CDS	2.7E-08	-2.0		nicht charakterisiert							

Abb. A 1: Differentielle CPXV-Genexpression zwischen 3D- und Monolayer-kultivierten NHEK bei hoher initialer Viruslast. 4 und 8 Stunden nach Infektion mit CPXV (MOI = 5) wurden infizierte Proben aus 3D- und 2D-Kultur (jeweils n = 3) für eine Transkriptomanalyse mittels HiSeq-Plattform (Illumina) präpariert und mittels Partek Flow-Software ausgewertet. Dargestellt sind die zwischen beiden Kultivierungsmodellen differentiell exprimierten viralen Gene zu beiden Zeitpunkten. Als hoch- bzw. herunterregulierte Gene wurden hier alle Gene mit einem korrigierten p-Wert (FDR: false discovery rate) von < 0,05, einer Readzahl von > 100 und einem FC von > |2| erfasst. Grün hinterlegt sind Gene der frühen und rot hinterlegt Gene der intermediären bzw. späten viralen Transkription. Weiß hinterlegt sind Gene, deren Expressionsmuster nicht charakterisiert ist. FC: Fold Change.

3D CPXV vs. Haut CPXV									
hochregulierte CPXV-Gene				herunterregulierte CPXV-Gene					
Gen	FDR	FC		Gen	FDR	FC			
CPXV179 CDS	2.0E-100	12.5		CPXV038 CDS	8.4E-40	-4.3			
ati	7.0E-35	6.4		CPXV059 CDS	1.3E-61	-4.2			
CPXV180 CDS	4.8E-26	5.0		CPXV212 CDS	8.3E-37	-4.2			
CPXV194 CDS	3.1E-59	3.5		VGF	4.9E-73	-4.1			
CPXV066 CDS	3.5E-31	3.3		CPXV058 CDS	5.6E-78	-3.9			
CPXV183 CDS	2.1E-23	3.2		CPXV220 CDS	4.3E-62	-3.4			
CPXV145 CDS	1.1E-26	3.1		CPXV122 CDS	0.0E+00	-3.1			
CPXV146 CDS	1.0E-21	3.0		CPXV070 CDS	6.0E-48	-3.1			
CPXV149 CDS	2.1E-17	2.9		CPXV019 CDS	7.3E-118	-3.1			
CPXV067 CDS	1.8E-18	2.8		CrmD	3.0E-64	-2.7			
CPXV150 CDS	5.3E-16	2.8		CPXV016 CDS	4.1E-116	-2.6			
CPXV144 CDS	7.3E-26	2.8		CPXV017 CDS	3.6E-49	-2.5			
CPXV216 CDS	4.6E-10	2.7		CPXV213 CDS	1.3E-61	-2.5			
CPXV112 CDS	1.1E-13	2.7		CPXV049 CDS	8.1E-13	-2.4			
CPXV195 CDS	4.5E-62	2.6		crmB	3.3E-40	-2.4			
CPXV143 CDS	3.5E-15	2.6		CPXV069 CDS	9.9E-14	-2.4			
CPXV161 CDS	3.7E-14	2.6		CPXV065 CDS	1.1E-21	-2.3			
CPXV102 CDS	1.2E-19	2.5		CPXV156 CDS	1.3E-37	-2.3			
CPXV078A CDS	1.5E-46	2.5		CPXV186 CDS	1.0E-22	-2.3			
CPXV084 CDS	3.6E-41	2.5		CPXV114 CDS	2.5E-16	-2.3			
vCD30	3.4E-13	2.5		CPXV082 CDS	9.6E-12	-2.2			
CPXV148 CDS	4.6E-11	2.4		CPXV206 CDS	1.1E-24	-2.2			
CPXV103 CDS	2.7E-08	2.4		CPXV062 CDS	3.6E-27	-2.2			
CPXV201 CDS	9.4E-10	2.4		CPXV010 CDS	9.8E-39	-2.2			
CPXV014 CDS	2.9E-10	2.4		CPXV039 CDS	4.2E-36	-2.2			
CPXV001 CDS	6.0E-22	2.4		CPXV048 CDS	2.3E-10	-2.2			
CPXV152 CDS	9.7E-19	2.3		CPXV047 CDS	9.9E-15	-2.2			
CPXV229 CDS	8.2E-04	2.3		CPXV184 CDS	9.5E-24	-2.2			
CPXV142 CDS	9.9E-09	2.2		CPXV218 CDS	2.1E-22	-2.1			
CPXV162 CDS	2.8E-14	2.2		CrmA	2.8E-09	-2.1			
CPXV104 CDS	1.4E-07	2.2		CPXV187 CDS	5.4E-152	-2.1			
CPXV095 CDS	4.2E-13	2.1		CPXV018 CDS	9.2E-25	-2.1			
CPXV111 CDS	9.8E-09	2.1		CPXV025 CDS	1.4E-04	-2.0			
CPXV169 CDS	7.3E-15	2.1							
CPXV151 CDS	1.0E-12	2.1							
CPXV034 CDS	8.4E-11	2.1							
CPXV135 CDS	9.5E-11	2.1		frü	he Genexpressio	n			
CPXV147 CDS	1.3E-17	2.1		intermediäre/späte Genexpression					
CPXV079 CDS	2.2E-32	2.0		nicht charakterisiert					
CPXV159 CDS	4.9E-16	2.0							
CPXV165 CDS	7.4E-34	2.0							

Abb. A 2: Differentielle CPXV-Genexpression zwischen 3D-kultivierten NHEK und korrespondierender *in vitro* generierter Haut. Infizierte Proben 3D-kultivierter NHEK (MOI = 0,01; 48 h *p.i.*) und *in vitro* generierter Haut (hohe MOI; 18 h *p.i.*) wurden für eine Transkriptomanalyse mittels HiSeq-Plattform (Illumina) präpariert und mittels Partek Flow-Software ausgewertet. Dargestellt sind die zwischen beiden Kultivierungsmodellen differentiell exprimierten viralen Gene. Als hochbzw. herunterregulierte Gene wurden hier alle Gene mit einem korrigierten p-Wert (FDR: *false discovery rate*) von < 0,05, einer Readzahl von > 100 und einem FC von > |2| erfasst. Grün hinterlegt sind Gene der frühen und rot hinterlegt Gene der intermediären bzw. späten viralen Transkription. Weiß hinterlegt sind Gene, deren Expressionsmuster nicht charakterisiert ist. FC: *Fold Change*.

2.0

3.4E-11

CPXV134 CDS